

Aus dem Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. C. Röcken

Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister

Leitung: Prof. Dr. med. W. Klapper

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

An der Christian-Albrechts-Universität

**INTRATUMORALE HOMOGENITÄT DER EPITHELIALEN-
MESENCHYMALEN TRANSITION, DES
TUMORSTAMMZELLENGEHALTES UND DES LYMPHATISCHEN
INFILTRATES IN MAMMAKARZINOMEN**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

MEIKE WIEDERMANN

aus Dortmund

Kiel, **2013**

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. Klapper, Institut für Pathologie**
- 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Kalthoff, Institut für Experimentelle
Tumorforschung**

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2014

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 08.12.2013

gez.: Prof. Dr. J. Roider

Inhaltsverzeichnis

Legende	IV
1. Einleitung.....	1
1.1. Das Mammakarzinom	1
1.2. Epithelial-mesenchymale Transition.....	1
1.3. Tumorstammzellen	4
1.4. Lymphatische Zellen in malignen Tumoren	6
1.5. Fragestellung	7
2. Material und Methoden.....	8
2.1. Datenerhebung und Patientenkollektiv	8
2.2. Untersuchungsmaterial und Vorbereitung.....	9
2.3. Herstellung von TMAs	10
2.4. Antikörper	10
2.5. Immunhistochemische Färbungen	12
2.6. Immunfluoreszenz- Färbungen	14
2.7. Interne Kontrollen der Färbungen.....	15
2.8. Mikroskopische Auswertung	16
2.9. Statistik.....	18
3. Ergebnisse.....	19
3.1. Darstellung und Vorkommen der EMT- Marker in der Immunhistochemie im Mamma Normalgewebe	19
3.2. Darstellung, Vorkommen und Verteilung der EMT- Marker in der Immunhistochemie im pathologisch veränderten Brustgewebe (Invasiver Tumor/DCIS).....	19
3.3. Darstellung, Vorkommen und Verteilung der lymphatischen Zellen im Brustdrüsen-Normalgewebe, im DCIS und im invasiven Tumor	25
3.4. Darstellung, Vorkommen und Verteilung der Tumorstammzellen im Brustdrüsen-Normalgewebe, im DCIS und im invasiven Tumor	30
4. Diskussion.....	38
5. Zusammenfassung	47
6. Literaturverzeichnis	48

III

7. Danksagung	53
8. Publikationen	54
9. Lebenslauf	55

Legende

DCIS	Duktales Karzinom in situ
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
LCIS	Lobuläres Karzinom in situ
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
PanCK	Panzytokeratin
TIL	Tumor-Infiltrierende Leukozyten
TMA	Tissue Micro Array

1. Einleitung

1.1. Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist mit ca. 72.000 Neuerkrankungen jährlich in Deutschland die häufigste Krebserkrankung der Frau. Auch weltweit gesehen ist für Frauen Brustkrebs die häufigste onkologische Diagnose. Etwa jede 9. Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 61 Jahren (Robert-Koch-Institut 2012). Die Therapie der Wahl ist die chirurgische Entfernung über eine brusterhaltende operative Therapie mit adjuvanter Radiatio. Neben der operativen Therapie und der Bestrahlung sind eine nedoadjuvante und adjuvante antihormonale und Chemotherapie in Abhängigkeit des Tumorstadiums indiziert (AWMF 2012).

Das Mammakarzinom ist eine Erkrankung, deren Definition anhand des Ursprungs der Tumorzellen histologisch unterschieden wird. In bis zu 80% der Mammakarzinome bilden Zellen der Milchgänge den Primarius, das duktales Karzinom. Hingegen werden Tumore der Lappchen als lobuläre Karzinome bezeichnet und machen etwa 10 % der Mammakarzinome aus (Weigelt, Peterse et al. 2005). Beide Tumorentitäten besitzen nicht-invasive Vorstufen, die je nach Zellursprung duktales oder lobuläres Karzinom in situ (DCIS bzw. LCIS) genannt werden. Aus diesen präinvasiven Läsionen können invasive Tumore entstehen, die dann auch das Potential zur Metastasierung besitzen (Hannemann, Velds et al. 2006).

Die relative 5-Jahres- Überlebensrate liegt aktuell bei 86%. Auch wenn die Krebssterblichkeit generell in den letzten Jahrzehnten durch Fortschritte in der Diagnostik und Therapie gesenkt werden konnte, ist auch heute die Heilung von Mammakarzinomen häufig durch Metastasen und Rezidive limitiert. Der Metastasierungsprozess und die lokale Invasion in das umliegende Gewebe sind auf molekularer Ebene komplexe Geschehen, die durch viele, zum Großteil unbekannte Faktoren beeinflusst werden.

1.2. Epithelial-mesenchymale Transition

Um die Basalmembran zu durchbrechen und dann zu metastasieren, müssen die zuvor differenzierten Zellen des epithelialen Gewebes sich aus ihrem Zellverband lösen und über Migration Kontakt zu Blut- oder Lymphgefäßen bekommen. Dabei verlieren die Zellen typische Eigenschaften wie kohäsive Interzellularbrücken und nehmen morphologische

Eigenschaften von mesenchymalen Zellen an. Nach der Dissemination in fremdes Gewebe readaptieren sich die metastasierenden Zellen und bilden meist morphologisch wieder Zellverbände mit epithelialen Eigenschaften. Dieser Prozess wurde 1982 von Greenburg und Hay zuerst beschrieben und wurde als Epithelial-mesenchymale- Transition (EMT) bezeichnet (Greenburg and Hay 1982). Die EMT, der Wechsel zwischen epithelialer zu mesenchymaler und wieder zu epithelialer Differenzierung, wird als physiologischer Prozess während der embryonalen Entwicklung und der Wundheilung beschrieben. Als pathologischer Prozess beschreibt er einen Mechanismus, bei dem epitheliale Zellen ihre typischen Eigenschaften verlieren und dafür mesenchymale Merkmale annehmen und somit die Potenz erhalten, sich dem physiologischen Zellverband zu entziehen und über Invasion und Dedifferenzierung zum invasiven Karzinom zu führen (Drasin DJ 2011).

Epitheliale Zellen sind Zellen in einem Zellverbund, die über verschiedene Zell-Zell-Kontakte verbunden sind und somit eine Barrierefunktion erfüllen können. Desmosomen und Adhärens- Kontakte, die für die mechanische Stabilität verantwortlich sind, verbinden die Zellen lateral untereinander, wobei Cadherine die Transmembranproteine bilden. Zudem gibt es Verschlusskontakte, auch Tight junctions genannt, die aus den Transmembranproteinen Claudin und Occludin bestehen. Dadurch sind die Zellen zudem von einer Zellpolarität geprägt, sodass sie jeweils eine apikale und eine basolaterale Plasmamembran besitzen. Das Zytoskelett ist durch Aktinfilamente vor allem dicht unter der Plasmamembran und den Zytokeratinfilamenten, den Intermediärfilamenten der epithelialen Zelle, aufgebaut. Vor allem die basale Zellseite bindet an die extrazelluläre Matrix und an die Basalmembran (Lüllmann-Rauch 2006).

Im Gegensatz dazu bilden mesenchymale Zellen ein diffuses Netzwerk, das durch Kommunikationskontakte, Gap Junctions, verbunden ist. Mesenchymale Zellen sind vor allem mobile Zellen, die um ihre gesamte Plasmamembran diffus mit der extrazellulären Matrix verbunden sind. Ihr Hauptintermediärfilament ist Vimentin. Im Vergleich zu epithelialen Zellen haben mesenchymale Zellen ein spindelförmiges Aussehen (Wever, Pauwels et al. 2008).

Der Hauptvorgang der EMT ist die Reduktion der Zellkontakte, somit der Verlust der zellulären Polarität und die Änderung des Zellgerüsts und der Gewebsarchitektur, was zur veränderten Zellmorphologie führt. Es kommt zum sogenannten Cadherin- Switch (Wever, Pauwels et al. 2008). Die Expression von E- Cadherin, welches eine wichtige Rolle in der

Ausbildung der Adhärenskontakte spielt, wird verhindert, während die Expression von N-Cadherin und Fibronektin induziert wird. Zusätzlich wird Vimentin, das für mesenchymale Zellen typische Intermediärfilament, vermehrt gebildet (Mani, Guo et al. 2008). Außerdem ist eine vermehrte Produktion von extrazellulären Proteinasen, Matrix- Metalloproteinasen, zu beobachten. Zellen, die diese mesenchymalen Eigenschaften erworben haben, sind in der Lage sich aus ihrem bisherigen Zellverband zu lösen und werden so zur Migration und Invasivität fähig. Dies ist die Voraussetzung zur Metastasierung. Der histologische Nachweis von EMT in malignen Erkrankungen ist mit einer erhöhten Rezidivrate und einer reduzierten Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert. Dies konnte für unterschiedliche Tumorentitäten nachgewiesen werden (Brabletz, Hlubek et al. 2005; Wever, Pauwels et al. 2008; Micalizzi, Farabaugh et al. 2010; Drasin DJ 2011; Stoyianni, Goussia et al. 2012). Metastasen von epithelialen Tumoren sind meistens in einem definierten Zellverband mit epithelialen Eigenschaften aufgebaut. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass der Prozess der EMT eine Dynamik beschreibt, die wieder umkehrbar ist. Die Umwandlung einer Zelle von mesenchymalen Eigenschaften zu einer Zelle mit epithelialen Merkmalen wird Mesenchymal-Epitheliale Transition (MET) genannt (Brabletz, Hlubek et al. 2005).

E- Cadherin wird durch das Gen CDH-1 codiert. Ein E- Cadherin-Verlust, und damit der erste Schritt zur EMT, kann verschiedene Ursachen haben. Eine genetische Mutation des Genes kann nicht der alleinige Auslöser für die EMT sein, da sie zum dauerhaften Verlust der E-Cadherin Expression führt und mit MET nicht vereinbar wäre. Eine reversible Inaktivierung von E-Cadherin ist sehr viel wahrscheinlicher in der EMT und kann durch veränderte Transkription beziehungsweise Transkriptionsfaktorenbindung an den Promotor des E-Cadherin-Gens erfolgen. Transkriptionsfaktoren, die die Expression von E-Cadherin regulieren, sind Snail, auch Snai-1 genannt, Slug, auch Snai-2 genannt, Zeb1, Zeb2 und Twist. Weitere Faktoren sind Six1 und FoxC2. Snail, Slug und Zeb1 sind Zink- Finger-Proteine, Twist ist ein Basic-Helix-Loop-Helix Faktor. Diese Transkriptionsfaktoren beeinflussen ihre Funktionsweise auch gegenseitig. So ist Slug für die durch Twist induzierte Hemmung des CDH-1 Gens wichtig, während Snail und Twist erst für die maximale Anreicherung von Zeb1 sorgen. Es konnte gezeigt werden, dass die alleinige Ausschaltung des CDH1- Gens und damit die fehlende Expression von E-Cadherin zu einer EMT-Induktion führt, was die Bedeutung von E-Cadherin und seinen Transkriptionsfaktoren unterstreicht (Brabletz 2001; Wever, Pauwels et al. 2008; Schmalhofer, Brabletz et al. 2009; Drasin DJ 2011; Soini, Tuhkanen et al. 2011). Weitere Mechanismen zur EMT Induktion sind

die Hypermethylierung des E-Cadherin Promotors, mikroRNAs, die die Gen-Expression posttranskriptional hemmen und Gewebhypoxie (Wever, Pauwels et al. 2008; May CD 2011; Mimeault and Batra 2013). Zudem wird die E- Cadherinexpression von verschiedenen Signalwegen wie zum Beispiel TGF beta, WNT, Notch und Hedgehog reguliert (Takebe, Warren et al. 2011). Der WNT Signalweg wird intrazellulär über beta-Catenin vermittelt und induziert über eine erhöhte Slug-Expression eine EMT (Schmalhofer, Brabletz et al. 2009). Es konnte am Kolonkarzinom durch immunhistochemische Färbungen gezeigt werden, dass die intrazelluläre beta-Catenin Verteilung von der Lokalisation der Zelle im Tumor abhängt. Zellkern-assoziiertes beta-Catenin, was mit erhöhter EMT-Induktion einhergeht, war vor allem in der Tumorperipherie zu finden, während sich im Tumorzentrum beta-Catenin meist membranständig oder seltener auch zytoplasmatisch anfärben ließ. Die Tumorperipherie wird daher auch als Invasionsfront des Tumors bezeichnet (Brabletz 2001). An den Beispielen des Cervix-Karzinoms, des Kolonkarzinoms sowie des Mammakarzinoms wurde auch eine erhöhte Snail-Expression in Tumorzellen mit unmittelbarer Nachbarschaft zu Stromazellen nachgewiesen (Wever, Pauwels et al. 2008; Vincent, Neve et al. 2009; Micalizzi, Farabaugh et al. 2010). Diese Hinweise deuten auf eine intratumorale Heterogenität hin, welche das Auftreten von regionalen Unterschieden in der Expression im gleichen Tumor angibt. Intratumorale Heterogenität bedeutet, dass Zellen in einem Tumorverband unterschiedliche Aufgaben und Fähigkeiten haben, sozusagen hierarchisch angeordnet sind (May CD 2011). Ein unterschiedliches Expressionsmuster könnte im Umkehrschluss für ein heterogenes Aktivitätsmuster der Tumorzellen sprechen (Aziza Nassar 2010).

1.3. Tumorstammzellen

Tumorstammzellen sind definiert als Zellen, die einerseits neue Tumorformationen bilden können, sich selbst erneuern können und andererseits aber auch differenzieren können und somit die zelluläre Vielfalt des Ursprungtumors wiederherstellen können (Civenni, Walter et al. 2011). Die Erstentdeckung der Tumorstammzelle erfolgte im hämatopoetischen System 1994 von Lapidot (Lapidot, Sirard et al. 1994). Lapidot et al. konnten anhand eines Versuchsaufbaus mit immunsupprimierten Mäusen zeigen, dass nur eine bestimmte Untergruppe an Leukämiezellen, die den Mäusen injiziert wurden, eine Leukämie der Maus hervorrufen konnte. Diese Untergruppe von Leukämiezellen wurde mittels Oberflächenmarker in der Durchflusszytometrie bestimmt. Oberflächenmarker für Zellen

werden nach dem „cluster of differentiation“- System eingeteilt und benannt, welches mit CD abgekürzt wird (Coussens and Werb 2002).

Bis heute konnten Tumor-initiierende-Zellen in vielen Tumorentitäten nachgewiesen werden (Al-Hajj 2003; Singh, Clarke et al. 2004; Collins 2005; Fang 2005; Kim, Jackson et al. 2005; Li, Heidt et al. 2007; O'Brien, Pollett et al. 2007). Al- Hajj et al. zeigten, dass das von Lapidot entworfene Modell auch auf das Mammakarzinom, einen soliden Tumor, übertragbar ist. Er teilte Mammakarzinomzellen anhand ihrer Oberflächenmarker auf und zeigte anhand eines Mausmodells Tumor-bildende- Zellen des Mammakarzinoms auf. Wenige injizierte Zellen der Oberflächenmarkerkombination $CD44^{+}/CD24^{-}$ Zellen waren ausreichend, um in Mäusen Mammakarzinome zu bilden. Zellen mit anderen Oberflächenmarkern konnten dies nicht erreichen. Die $CD44^{+}/CD24^{-}$ Zellen nannte Al- Hajj deswegen Tumor- initiierende-Zellen oder Tumor Stamm Zellen (Al-Hajj 2003). CD44 und CD24 sind Oberflächenproteine einer Zelle und dienen als Adhäsionsmoleküle. Je nach Tumor fand Al Hajj 11-35% der $CD44^{+}/CD24^{-}$ Zellen. Hingegen sind andere Autoren der Meinung, dass Tumorstammzellen nur eine kleine Minderheit der Tumormasse darstellen (Mani, Guo et al. 2008; Morel, Lievre et al. 2008). Die Tumore, die sich in den Mäusen durch die $CD44^{+}/CD24^{-}$ Zellen gebildet hatten, enthielten auch wieder Nicht-Tumor- initiierende- Zellen. Dies spiegelt einerseits die Heterogenität der Karzinome wider, aber auch wichtige, definierende Eigenschaften von Tumorstammzellen.

In der letzten Zeit wurden zunehmend mehr Oberflächenmarker beschrieben, die typisch für Tumorstammzellen sein sollen. Beispiele für weitere zur Zeit untersuchte Tumorstammzellmarker sind CD133, Integrin- alpha-6 und die Aldehyddehydrogenase-Aktivität (Alkatout, Kabelitz et al. 2008; Park, Lee et al. 2010). CD49f, auch Integrin-alpha-6 genannt, ist ebenfalls auf der Zelloberfläche lokalisiert und bindet mit beta1-Integrin (CD29) oder mit beta4-Integrin (CD104) über Laminin an die extrazelluläre Matrix (Meyer, Fleming et al. 2010). Honeth et al. beschreiben eine signifikante Überexpression von CD49f auf $CD44^{+}/CD24^{-}$ Zellen, was diese beiden Stammzellmarker in einen Zusammenhang bringt (Honeth, Bendahl et al. 2008). CD49f ist als Oberflächenmarker auf Zellen mit Stammzeleigenschaften beschrieben worden (Vassilopoulos, Wang et al. 2008; Meyer, Fleming et al. 2010; Rauner and Barash 2012; Vieira, Ricardo et al. 2012).

1.4. Lymphatische Zellen in malignen Tumoren

Lymphozyteninfiltrate sind häufig um maligne Tumoren zu finden, so auch bei Mammakarzinomen (Mohammed, Going et al. 2012). Meist liegen die Zellen der Immunabwehr im umliegenden Stroma, seltener jedoch auch in den Tumornestern (Fu, Zuo et al. 2013). Diese lymphatischen Zellen in unmittelbarer Nähe zu den malignen Zellen werden Tumor-infiltrierende Leukozyten genannt (Zhang, Schiller et al. 1998).

Hierbei zeigt der Oberflächenmarker CD20 alle B- Lymphozyten auf, während CD3 alle T- Lymphozyten markiert. Die zytotoxischen T- Zellen werden durch eine CD8- Färbung identifiziert. Der Anti- FoxP3- Antikörper markiert regulatorische T- Zellen.

Die Bedeutung des Vorkommens von lymphatischen Zellen in Tumoren ist noch nicht geklärt und wird zur Zeit in der aktuellen Literatur kontrovers diskutiert (DeNardo and Coussens 2007; Gupta, Joshi et al. 2007; Ghebeh, Barhoush et al. 2008; Murri, Hilmy et al. 2008; Zlobec 2009; Demaria, Pikarsky et al. 2010; Kim, Jeong et al. 2012; Löfdahl, Ahlin et al. 2012). Die Immunreaktion um einen Tumor wird von einigen Autoren als körpereigener Versuch der Tumorabwehr gedeutet. Alternativ dazu könnte die Infiltration von lymphatischen Zellen eher passiv aufgrund der erhöhten Zytokinausschüttung von stark proliferierenden Tumoren begründet sein (DeNardo and Coussens 2007; Murri, Hilmy et al. 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass lymphatische Zellen auch eine EMT induzieren können. Es gelang im Mausmodell der Nachweis, dass $CD8^{+}$ -T Zellen eine EMT hervorrufen (Santisteban, Reiman et al. 2009). Diese Forschung zeigt eine Verbindung von lymphatischen Zellen und der Tumorbilogie auf.

Zusammenfassend ist der komplexe Prozess der Metastasierung und der Tumorprogression auf molekularer Ebene weiterhin offen und wird unter anderem mit den Mechanismen der EMT, den Tumorstammzellen und mit den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten in Verbindung gebracht. Aufgrund der Assoziation dieser Mechanismen zur erhöhten Migration und Tumorbildung, vor allem ausgehend von einer Invasionsfront (Brabletz 2001), soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob eine intratumorale Heterogenität in Bezug auf diese Mechanismen mit der Immunhistochemie und der Immunfluoreszenz nachweisbar ist.

1.5. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war die Klärung folgender Fragen:

1. Ist es möglich die etablierten durchflusszytometrischen Detektionsmethoden zur Darstellung von potentiellen Tumorstammzellen auf immunhistologische Methoden zu übertragen?
2. Was ist die Frequenz und Lokalisation von potentiellen Tumorstammzellen im Mammakarzinom in vivo?
3. Lässt sich eine biologische Heterogenität der Tumorzellen und des reaktiven Begleitinfiltrates innerhalb eines Mammakarzinoms mit Hilfe der Immunhistochemie erfassen?
4. Was ist die Frequenz und Lokalisation von EMT-Markern und dem reaktiven Begleitinfiltrat des Mammakarzinoms?
5. Korreliert die intratumorale Heterogenität mit dem Krankheitsverlauf beim Mammakarzinom?

2. Material und Methoden

2.1. Datenerhebung und Patientenkollektiv

In dieser Arbeit wurden Patientinnen mit einem Mammakarzinom einbezogen, die zwischen Juli 2008 und September 2009 im Mamma Zentrum des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe zur Behandlung und Nachsorge betreut waren. Die Selektion von Patientinnen aus diesem Kollektiv bedingte einen Tumordurchmesser unter 2 cm, sodass der Tumor auf einem Objektträger als Ganzes beurteilbar war. Dies ermöglichte die Aussage über die Lokalisation vom Innen- und Außenbereich des Tumors. Die Tumore sollten möglichst keine Lokal- oder Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose aufweisen. Dies entspricht einem Tumorstadium von T1 N0 M0. Aus diesem Kollektiv wurden die Patientendaten auf aufgetretene Rezidive oder Metastasen im Zeitraum zwischen der Erstdiagnose und dem Tag des Studienschlusses untersucht. Aus dem Gesamtkollektiv von 424 Patientinnen wurden 13 Patientinnen mit einem T1-Mammakarzinom und einem Rezidiv in dem beobachteten Nachbehandlungszeitraum ausgewählt und in die vorliegende Arbeit einbezogen.

Eine äquivalente Kontrollgruppe in Bezug auf das Tumorstadium bei Erstdiagnose aus dem Nachsorgeprogramm des Universitätsklinikums Kiel war ohne Metastasen oder Rezidive. Es wurden für jeden Fall zwei Kontrollfälle mit möglichst vielen übereinstimmenden Parametern selektiert. Die Parameter und damit die Kriterien für die Korrelation waren in absteigender Wichtigkeit das TNM- Stadium, der histologische Subtyp des Mammakarzinoms, die Differenzierung des Tumors, der Hormon- und Her2Neu- Rezeptorstatus und das Alter der Patienten. Im Falle von fehlenden Übereinstimmungskriterien wurde nur eine Kontrolle dem entsprechenden Fall zugeordnet, sodass schließlich insgesamt 18 Patientinnen dieser Gruppe zugeordnet wurden. Eine Gegenüberstellung der unterschiedlichen Parameter in den Patientengruppen mit und ohne Rezidiv ist der **Tabelle 1** zu entnehmen.

Die mediane Nachbeobachtungszeit aller einbezogenen Patientinnen lag bei 50,5 Monaten (minimale Nachbeobachtungszeit: 9 Monate; maximale Nachbeobachtungszeit: 132 Monate). Keine der in die Studie eingeschlossenen Patientinnen erhielt eine neoadjuvante Chemo- oder Radiotherapie bevor sie einer individuell adäquaten postoperativen Tumorthherapie zugeführt wurden. Diese enthielt je nach Indikation Chemo-, Radio- und Hormontherapie. Es wurden

außerdem Brustdrüsengewebe mit DCIS (Duktalem Carcinoma in situ) und physiologischem Brustdrüsengewebe aus Gewebeproben von Mammareduktionsplastiken als Kontrollen untersucht. Alle Karzinome wurden nach den WHO Kriterien (Tavassaoeli and Davilee 2003) beurteilt, das Tumorstadium wurde auf Grundlage des TNM Systems festgelegt.

Diese Arbeit wurde von der Ethikkommission der Universität Kiel genehmigt (D 426/10). Zusätzlich haben alle lebenden Patientinnen schriftlich in die Einsicht ihrer klinischen Daten und der Teilnahme an wissenschaftlichen Studien eingewilligt.

Klinische Parameter	Fälle mit Rezidiv (n=13)	Fälle ohne Rezidiv (n=18)
T1	13/13	18/18
N0	10/13	18/18
M0	11/13	16/18
duktal	8/13	14/18
lobulär	2/13	3/18
andere Histologie	3/13	1/18
(≤)G2	8/13	12/18
ER+ (≥3)	7/13	15/18
PR+ (≥3)	6/13	12/18
Her2neu (≥2)	2/13	4/18
Alter (Durchschnitt)	51	54,78
max. Alter	68	72
min. Alter	36	36
Nachbeobachtungsperiode (Median in Monaten)	99	54

Tabelle 1: Gegenüberstellung der klinischen Parameter in den untersuchten Gruppen mit bzw. ohne Rezidiv in dem untersuchten Nachbeobachtungszeitraum. Die jeweils zweite Zahl („n“) stellt die Gesamtzahl der untersuchten Fälle dieser Gruppe dar. Die jeweils erste Zahl in einem Feld bezieht sich auf die Anzahl der Fälle, auf die die jeweiligen klinischen Parameter zutreffen.

2.2. Untersuchungsmaterial und Vorbereitung

Untersucht wurden Resektatpräparate der jeweiligen Ersttumoren und der Mammareduktionsplastiken, die in dem Institut für Pathologie der Universitätsklinikums Schleswig Holstein, Campus Kiel archiviert und aufbewahrt werden. Diese wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Von diesem Material wurden mit einem Schlittenmikrotom 3µm- dicke Schnitte angefertigt. Nach einem Wasserbad bei 45-55°C zur Oberflächenentspannung wurden diese Schnitte dann auf beschichtete Objektträger von Paul-

Marienfeld- GmbH (Lauda-Königshofen, Deutschland) oder Leica (Solms, Deutschland) aufgezogen. Die Schnitte wurden daraufhin zur Trocknung für mindestens 12 Stunden im Brutschrank bei 37°C gelagert.

2.3. Herstellung von TMAs

Zur Herstellung der Tissue-Micro-Arrays wurden die Tumoren jeweils an 2 verschiedenen Stellen mit einem Mindestabstand von 2 mm im inneren und äußeren Bereich des Tumors mit einem manuellem Tissue Arrayer (MTA1, Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA) gestanzt. So entstanden pro Fall oder Kontrolle jeweils 4 Gewebsstanzen, Cores, von einem Durchmesser von 1mm. Die bildliche Veranschaulichung der auf einen Objektträger aufgetragenen TMAs zeigt **Abbildung 1**.

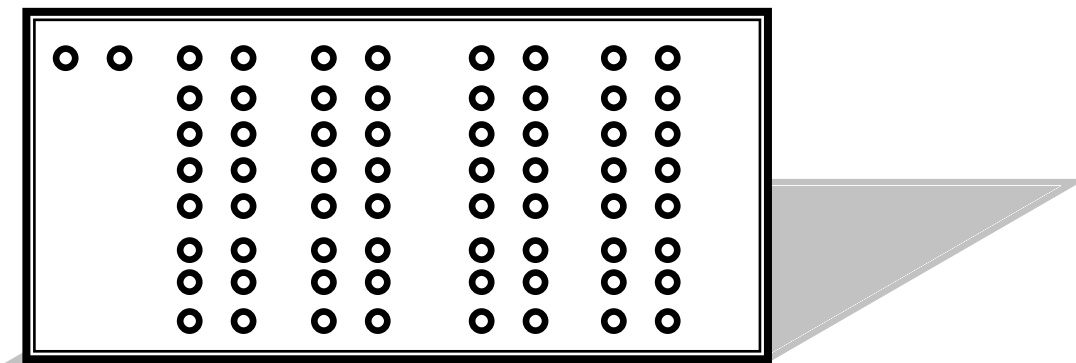


Abbildung 1: Schema von TMA- Stanzen auf einem Objektträger. Links oben zwei Kontrollgewebe, sonst je zwei Cores der Tumorpheripherie und des Tumorzentrums.

2.4. Antikörper

Für die Untersuchungen wurden entsprechende Antikörper herausgesucht und zunächst in dem vom Hersteller vorgeschlagenem Färbeprotokoll mit der angegebenen Antikörper-Verdünnung auf Gewebeschnitten von Tonsillen, Kolonkarzinom und vom Mammakarzinom getestet. Der **Tabelle 2** sind alle getesteten Antikörper zu entnehmen.

Antikörper	Hersteller	Katalognummer/ Klonnummer
Cytokeratin 7	Santa Cruz	sc-17116
Slug	Santa Cruz	sc-15391
Slug	Cell Signaling Technology	C1967
Snail	Cell Signaling Technology	SN9H2
Snail	abcam	ab85931
FoxC2	abcam	ab55004
Twist	abcam	ab 50581
Zeb1	Atlas	HPA027524
CD24	Thermo scientific	SN3b
CD24	Santa Cruz	sc7034
CD24	Anaspec	
CD44	abcam	ab24504
CD44	Neomarkers	156-3C11
CD44	epitomics	EPR1013Y
CD44	Atlas	HPA005785
CD49f	Thermo scientific	MA1-80530
CD49f	Atlas	HPA012696
CD3	NeoMarkers	RM-9107-S
CD8	DAKO	M7103
CD20	eigene Herstellung	
FoxP3	abcam	ab20034
Keratin, Pan	NeoMarkers	MS 343-P
Ki-67	eigene Herstellung	

Tabelle 2: Alle im Rahmen dieser Studie getesteten primären Antikörper

Bei den Färbungen wurde darauf geachtet, dass das Färbeergebnis entsprechend dem aktuellen Stand der internationalen Literatur physiologisch und pathophysiologisch plausibel nachvollziehbar war. Falls dies nicht der Fall war, wurde das Färbeprotokoll schrittweise für jeweils einen Vorgangsschritt verändert. So kamen zum Demaskieren der Antigene verschiedene selbst hergestellte Pufferlösungen mit den pH Werten 3, 6, 8 und 9 zum Einsatz. Außerdem wurde versucht mit Proteinase K oder ohne Vorbehandlung zur Demaskierung ein Färbeergebnis zu erzielen, welches den heutigen Stand der Forschung über die Funktion und das Vorkommen der verschiedenen Antigene am eindeutigsten widerspiegelte. Zusätzlich wurden längere Einwirkzeiten an verschiedenen Schritten im Färbeprotokoll auf ihre Unterschiede im Färbemuster untersucht.

Folgende Antikörper mit den in **Tabelle 3** angegebenen Verdünnungen wurden für die vorliegende Arbeit schließlich verwendet:

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	pH	host	Färbevorgang
CD24	Thermo Scientific	1:50		6 mouse	Handfärbung
CD44	Atlas	1:200		6 rabbit	Handfärbung
CD49f	Atlas	1:50		6 rabbit	Handfärbung
Snail	abcam	1:100		6 rabbit	Handfärbung
Twist	abcam	1:200		6 rabbit	Handfärbung
Slug	Cell Signaling Thechnology	1:50		9 rabbit	Handfärbung
Zeb1	Atlas	1:300		6 rabbit	Handfärbung
CK7	Santa Cruz	1:100		6 goat	Handfärbung
CD3	NeoMarkers	1:100		6 rabbit	Automat/Bond
CD8	DAKO	1:100		6 mouse	Automat/Bond
CD20	eigene Herstellung	1:5		6 mouse	Automat/Bond
FoxP3	abcam	1:250		8 mouse	Handfärbung
Keratin, Pan (AE1/AE3)	NeoMarkers	1:200		8 mouse	Automat/Bond
Ki-67 / S5	eigene Herstellung	1:5		6 mouse	Automat/Bond

Tabelle 3: Primäre Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen und die Immunfluoreszenz-Färbungen

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden die in **Tabelle 4** aufgelisteten sekundären Antikörper genutzt.

Hersteller	Farbe	host	Spezifität
Invitrogen	Alexa 488 (grün)	donkey	anti goat
Invitrogen	Alexa 647 (gelb)	donkey	anti mouse
Invitrogen	Alexa 555 (rot)	donkey	anti rabbit

Tabelle 4: Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen

2.5. Immunhistochemische Färbungen

a) Manuelle Färbung

Nach einer 10 minütigen Einwirkzeit im Xylol wurden die Objektträger mit den zu untersuchenden Gewebeschnitten in zwei weitere Behälter mit Xylol überführt, um danach

eine absteigende Alkoholreihe in den Konzentrationen 100%, 98%, 96% und 70% zu durchlaufen. Auch hierbei waren von den verschiedenen Konzentrationen der Alkohollösungen mehrere Behälter vorhanden. Zum Blocken der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte in eine Methanollösung mit 6-8ml H_2O_2 gebracht. Dort verblieben sie 10 Minuten. Nach einem Spülvorgang mit destilliertem Wasser wurden die Antigene demaskiert. Hierzu wurden wie oben beschrieben verschiedene Vorgangsweisen verwendet. Falls möglich wurde als Standardverfahren mit einem Citratpuffer bei pH6 in einem Dampfkochtopf für drei Minuten die Demaskierung vorgenommen. Anschließend kamen die Objektträger in eine Glasküvette mit einem Tris- Waschpuffer. Die verwendeten und anderweitig getesteten Puffer sind der **Tabelle 5** zu entnehmen.

Puffer	pH	Pufferherstellung (+ destilliertes Wasser)
Puffer zur Antigende-maskierung	3	10,5g Citronensäure- Monohydrat mit NaOH (2N) eingestellt
	6	10,5g Citronensäure- Monohydrat mit ca. 65ml NaOH (2N) eingestellt
	8	18,6g EDTA (Triplex III) 0,01 mol/l mit ca. 22ml NaOH (2N) eingestellt
	9	1l pH 8 EDTA Puffer (0,01mol/l) und 30,285g Tris-base mit NaOH (2N) eingestellt
Tris- Waschpuffer		5ml Tween 20 (Hersteller: Merck), 9,0g Tris- Base, 68,5g Tris HCl, 7,8g NaCl

Tabelle 5: Verwendete Puffer.

Danach wurde der Primärantikörper mit Hama-Elisa Medac (Wedel, Deutschland) auf 100ml in der oben angegebenen Verdünnung angesetzt und auf die Objektträger getropft und verteilt. Die Einwirkzeit betrug eine Stunde bei Zimmertemperatur. Nach dreimaligem Spülen in Leitungswasser kamen die Schnitte zunächst zurück in den Tris-Waschpuffer, um anschließend 30 Minuten lang ca. 4 Tropfen pro Objektträger vom sekundären Antikörper einwirken zu lassen. Als sekundärer Antikörper wurde Histofine: Simple MAX PO (Multi) Universal Immuno-peroxidase Polymer von Medac (Wedel, Deutschland) verwendet. Abhängig davon mittels welchen Tieres der primäre Antikörper gewonnen wurde, wurde der sekundäre Antikörper spezifisch gegen Maus, Kaninchen, Ratte oder Ziege angewendet. Dem Einwirken des sekundären Antikörpers schloss sich wieder ein Spülvorgang an. Nachfolgend wurde je Objektträger 100µl DAB von Dako (Hamburg, Deutschland) aufgetropft und für 5-7 Minuten inkubiert. Nach einem erneuten Spülen mit Wasser kamen die Schnitte in eine Küvette mit Hämalaun nach Mayer in einer Verdünnung von 1:4 für 10 Minuten zum Gegenfärben. Daraufhin wurden nach einem weiteren Spülvorgang die Objektträger für zehn Minuten im Wasserbad bei Raumtemperatur belassen, um hiernach die aufsteigende Alkoholreihe in den oben genannten Konzentrationen zu durchlaufen. Nach dem 100%igem

Alkohol schlossen sich weitere Behälter mit Alkohol-Xylol Mischungen in einem Verhältnis von 1:1 an. Abschließend wurden die Schnitte in reines Xylol überführt, sodass es danach möglich war, sie mittels Pertex mit einem Deckglas abzudecken.

b) Automatische Färbung

Die immunhistochemischen Färbungen für die Markierung von CD3, CD8, CD20 und Ki67 sowie die Übersichtsfärbung mit Panzytokeratin, PanCK, wurden mit Hilfe des Färbeautomats Bond des Herstellers Leica Microsystems (Newcastle, UK) durchgeführt. Dazu wurde das Polymer Refine Detection System von Leica verwendet (Bestellnummer: DS9800, Newcastle, UK). Zuerst erfolgt die Inkubation des Präparates mit 3-4%igem Wasserstoffperoxid zur Blockung der endogenen Peroxidaseaktivität. Für die Antikörperdarstellung der Antigene CD8 (Klon: C8/144B), CD 20 und Ki67 wird ein Citratpuffer mit dem pH von 6 mit einer Einwirkzeit von 20 Minuten verwendet. Für das Antigen CD3 (Klon: SP7) wird derselbe Citratpuffer 30 Minuten belassen während der Anti- panCK (Klon: AE1/AE3) Antikörper mit einem EDTA Puffer des pH Wertes von 8 inkubiert wird. Nach einem Waschvorgang folgt die 15-20 minütige Inkubationszeit des primären Antikörpers. Zur Lokalisation des Primärantikörpers wird ein Post- Primary-IgG-Linker Reagenz von dem Färbeautomaten spezifisch gegen den Primärantikörper verwendet (z.B. Kaninchen-anti-Maus-IgG in Tris- gepufferter physiologischer Kochsalzlösung). Nach erneutem Waschen benutzt der Färbeautomat ein Polymer zur weiteren Verstärkung. Das Polymer besteht bei einem primären Maus Antikörper aus Anti- Kaninchen- Poly-HRP-IgG in Tris- gepufferter physiologischer Kochsalzlösung zur Lokalisation des Post-Primary Antikörpers. Im Anschluss wäscht der Automat die Präparate und gibt dann DAB hinzu. DAB ist 66 mM 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochloridlösung mit Stabilisator. Dieses Substratchromogen wird für 10 Minuten auf den Präparaten belassen und dient der Visualisierung des Komplexes als braunes Präzipitat. Die Kontrastfärbung erfolgt mit Hämatoxylin mit einer Dauer von 5 Minuten, woraufhin die Schnitte in destilliertes Wasser überführt werden.

2.6. Immunfluoreszenz- Färbungen

Die Vorbereitung der Gewebsschnitte oder der TMAs entspricht dem Vorgehen in der Immunhistochemie bis einschließlich dem Durchlaufen der absteigenden Alkoholreihe

(3x100%, 2x96%, 1x70%). Die Schnitte werden zum Transport und zur kurzzeitigen Aufbewahrung zwischen den im Weiteren erklärten Färbeschritten in einer Küvette mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung, dem DPBS-Puffer gelagert. Danach schließt sich direkt die Demaskierung im Dampfkochtopf für 3 Minuten mit den in **Tabelle 5** erwähnten Pufferlösungen an. Auch hierbei wurde versucht nach Möglichkeit als Standardverfahren den Citratpuffer bei einem pH-Wert von 6 zu nehmen. Der Primärantikörper wurde entsprechend seiner Verdünnung mit 100µl Hama-Elisa medac (Wedel, Deutschland) pro Objektträger angesetzt. Falls Doppel- oder Dreifachfärbungen durchgeführt wurden, so wurden die primären Antikörper zusammen auf 100µl pro Gewebsschnitt verdünnt. Die Verdünnung der Antikörper wurde auf die Objektträger aufgetropft und für eine Stunde in einer feuchten Kammer zur Vermeidung der Austrocknung der Schnitte bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgend schloss sich ein Spülvorgang mit DPBS-Puffer an, der nach dem Einwirken des sekundären Antikörpers wiederholt wurde. Ab dem Zeitpunkt des Ansetzens der Verdünnung des sekundären Antikörpers wurde in einem abgedunkelten Raum gearbeitet, damit die Fluoreszenz nicht vor der Beurteilung am Mikroskop an Intensität verlor. Der sekundäre Antikörper wurde auf 100µl mit DPBS-Puffer in der Verdünnung von 1:100 angesetzt. Auch hierbei wurden bei Mehrfachfärbungen die Antikörper zusammen in eine Verdünnung mit 100µl gegeben. Die Einwirkzeit betrug ebenfalls eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Zur Kernfärbung wurde DAPI (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) in einer Verdünnung von 1:5000 mit DPBS-Puffer angesetzt. Auch während der Einwirkzeit des 4',6-Diamidin-2-phenylindol, kurz DAPI, von zwei Minuten wurden die Schnitte in der feuchten Kammer aufbewahrt. Anschließend wurden die Objektträger wieder drei Mal mit DPBS-Puffer gespült. Zum Abdecken mit einem Deckglas wurde pro Objektträger ein Tropfen DAKO Fluoreszenz Mounting Medium (Dako, Glostrup, Dänemark) gegeben. Abschließend wurde zum Verschließen des Raumes zwischen Objektträger und Deckglas an den Seitenkanten etwas handelsüblicher, durchsichtiger Nagellack aufgetragen.

2.7. Interne Kontrollen der Färbungen

Während jeder Färbung von Ganzschnitten wurden außerdem Kontrollgewebe von der Tonsille, Kolonkarzinom oder von einem Mammakarzinom mit gefärbt. Diese Kontrollschnitte durchliefen wie die zu untersuchenden Gewebsschnitte alle im Färbeprotokoll feststehenden Vorgänge. Die Kontrollschnitte hatten ein definiertes, bekanntes

Färbemuster aufzuweisen, um die gesamte Färbung als erfolgreich zu validieren. Bei den Tissue- Micro- Arrays wurden sowohl die Kontrollstanzen auf dem selbigen TMA als auch hier ein Ganzschnitt von Kontroll-Mammakarzinomgewebe zur internen Kontrolle der Färbung hinzugezogen. Färbevorgänge, in denen die Kontrollen nicht das erwartete, zuvor bekannte Färbemuster zeigten, wurden verworfen.

Außerdem wurden sowohl immunhistochemische als auch Immunfluoreszenz-Färbungen an physiologischem Brustgewebe durchgeführt, um das entstehende Färbemuster mit dem des Karzinoms vergleichen zu können. Hierzu wurden Resektate von Brustreduktionsplastiken hinzugezogen.

2.8. Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Zeiss Axiophot, Zeiss GmbH, Jena, Deutschland). Von den zum Vergleich angefertigten Färbungen am histomorphologisch unauffälligen Brustgewebe wurden Fotos mit der Kamera Jenoptik ProgRes CF angefertigt. Ebenso wurden immunhistochemische Färbungen von Mammakarzinomareale fotografiert. Um die Bilder aufzunehmen wurde das Software- Programm ProgRes® CapturePro 2.7 von Jenoptik genutzt. Zur Durchführung des Weißabgleichs der Bilder wurde Adobe Photoshop verwendet.

Die Marker CD3, CD8, CD20, FoxP3 wurden ebenfalls an dem oben genannten Lichtmikroskop betrachtet und ausgewertet. Sie wurden an den TMAs gefärbt, die wie oben beschrieben je 2 Stanzen vom inneren und von äußeren Gebiet eines Tumors beinhalteten. Zur Auswertung wurde eine 400 fache Vergrößerung genutzt, sodass sich ein Areal mit vielen Tumorzellen darstellte. Die Tumorzellen wurden auf 100 Zellen ausgezählt, wobei registriert wurde, wie viele lymphatische Zellen sich in einem Verband von 100 Tumorzellen fanden. Die Färbung mit PanCK diente durch die Markierung von epithelialen Zellen dabei der Orientierung im mikroskopischen Bild.

Die Antikörper Snail, Slug, Twist und Zeb1 wurden ebenfalls immunhistochemisch auf den TMAs gefärbt. Die Stanzen wurden vor allem in Bezug auf die Intensität im Vergleich zum Färbemuster im Normalgewebe beurteilt. Außerdem konnten zum Beispiel bei dem Antikörper Zeb1 falsch negative Färbungen durch fehlende Anfärbung der Stromazellkerne identifiziert werden. Es wurde ein Score für die Positivität von 0-4 gewählt. Dabei wurde die Einteilung wie in **Tabelle 6** beschrieben, vorgenommen.

Positivitätsscore	positive Zellanfärbung in %
0	keine Positivität
1	0-25% positive Zellen
2	25-50% positive Zellen
3	50-75% positive Zellen
4	75-100% positive Zellen

Tabelle 6: Score zur Beurteilung der immunhistochemischen Färbemuster der EMT- Marker.

In dieser Arbeit wurde der Grenzwert bezüglich der Positivität der Färbung ab 1-100% positiv angefärbte Zellen festgelegt. Nur Färbungen ohne positive Anfärbung der Zellen mit dem untersuchten Marker, wurden als negativ gewertet. Dies entspricht einem Score von 0. Gewebstanzen, die auch auf wiederholt gefärbten TMAs nicht auswertbar waren, wurden durch Färbungen an den entsprechenden Ganzschnitten der Tumoren ergänzt.

Die Färbungen der Immunfluoreszenz wurden mit einem Axioplan 2 Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) beurteilt und fotografiert. Fotografiert wurden repräsentative Tumorareale, die morphologisch der konventionellen Färbung entsprachen und ausreichend interne Positivkontrollen aufwiesen. Dazu diente die eingebaute digitale Kamera SPOT RTTM slider (Diagnostic Instruments inc., Burroughs, Sterling Heights, MI, USA) und das Verarbeitungsprogramm VisisView 1.7.2 (Visitron Systems, Puchheim, Deutschland). Auch hierbei wurden fehlende Resultate der TMA-Färbungen mit Färbungen an Ganzschnitten ergänzt. Es wurde außerdem darauf geachtet nicht invasive Vorstufen wie zum Beispiel das duktales Karzinom in situ getrennt von den invasiven Anteilen des Tumors zu fotografieren, um später auch hier eine vergleichende Aussage treffen zu können.

Von jedem zu fotografierenden Areal wurden Bilder mit 4 unterschiedlichen Lichtfiltern gefertigt. Zytokeratin 7 dient der epithelialen Zellidentifizierung, DAPI der Darstellung der Zellkerne und zusätzlich in je einer Farbe die zwei zu kombinierenden Antikörper. Kombiniert wurden anti- CD44 und anti- CD24. Die andere Kombination bestand aus anti- CD49f und anti-CD24. Jeder TMA-Core wurde zweifach mit einer 400 -fachen Vergrößerung fotografiert. Anschließend wurden alle CK7 positiven Zellen manuell auf den Bildern ausgezählt und auf ihrer Expression von CD24, CD44 und CD49f hin untersucht.

2.9. Statistik

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurde zur Angabe der durchschnittlichen Färbeverteilung der Antikörper ein Mittelwert für die jeweilig betrachtete Untergruppe gebildet. Die Angabe der gezählten Zellen der Immunfluoreszenz kommt durch die Bildung des Medians zustande. Der Vergleich des Färbeverhaltens der verschiedenen Gewebe in ihren Untergruppen wurde mit Graph Pad Prism Software (La Jolla, USA) durchgeführt. Dazu wurde je nach vorhandenen Daten ein T-Test oder ein Fisher's Exact Test verwendet. Bei allen angewendeten Tests wird ein Signifikanzniveau von 5% zugrunde gelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Darstellung und Vorkommen der EMT- Marker in der Immunhistochemie im Mamma Normalgewebe

In der immunhistochemischen Färbung des physiologischen Brustgewebes wurden sowohl die Lobuli, als auch die Ducti lactiferi beurteilt. Eine immunhistochemische Färbung wurde ab einem Score von 1 als positiv gewertet. Die Darstellung der vier untersuchten EMT- Marker im fixierten Präparat war möglich. Die positive Färbung des Anti- Slug Antikörpers konnte in allen getesteten Fällen (3/3, 100%) in epithelialem, physiologischem Brustdrüsengewebe nachgewiesen werden. Dabei wurde das Vorkommen von Slug in den epithelialen Zellen mit einem Score von 1-2 beschrieben. Ebenso zeigten Snail und Twist ein konstantes Vorkommen in allen getesteten Präparaten (je 4/4, 100%). Die Färbung mit dem Anti- Snail Antikörpers zeigte dabei in den 4 untersuchten Proben eine starke Positivität und damit ein hohes Vorkommen im Normalgewebe. Der Score für das Vorhandensein des Proteins Snail wurde in jedem Präparat mit 4 bewertet. Dies bedeutet, dass Snail in mindestens 75% der normalen epithelialen Brustgewebszellen exprimiert wird. Etwa 25-75% der Zellen exprimierten Twist (Score 2-3). Zeb-1 hingegen kommt im normalen epithelialen Brustdrüsengewebe nicht vor und wurde in 100% der Fälle (4/4) mit einem Score von 0 bewertet. Beispiele zu den Färbungen der Normalgewebe sind in **Abbildung 7** gezeigt.

3.2. Darstellung, Vorkommen und Verteilung der EMT- Marker in der Immunhistochemie im pathologisch veränderten Brustgewebe (Invasiver Tumor/DCIS)

Zur Beurteilung des invasiven Tumors wurden alle 31 Patientenfälle untersucht. Jeder Tumor wurde mittels der Gewebstanzen der TMAs getrennt für sein Tumorzentrum und den äußeren Rand des Tumors analysiert, sodass insgesamt 62 Werte ermittelt wurden.

Der Zink- Finger Transkriptionsfaktor Snail war wie im Normalgewebe in 100% der auswertbaren Proben positiv (57/57). Bei der überwiegenden Mehrheit der Patienten (29/31) wurde Snail in über 75% der Epithelzellen gefunden. Die Anfärbung von Snail im invasiven Tumor unterschied sich nicht von der physiologischen Expression im gesunden Gewebe. Snail war zudem homogen im Mamma- Karzinom verteilt. Wie in den **Abbildungen 2, 3 und 7** zu sehen ist, gibt es keinen Unterschied der Verteilung bezüglich Tumorzentrum und

Tumorrand beziehungsweise zwischen den getesteten Gruppen mit oder ohne Rezidiv in der Nachbeobachtungszeit.

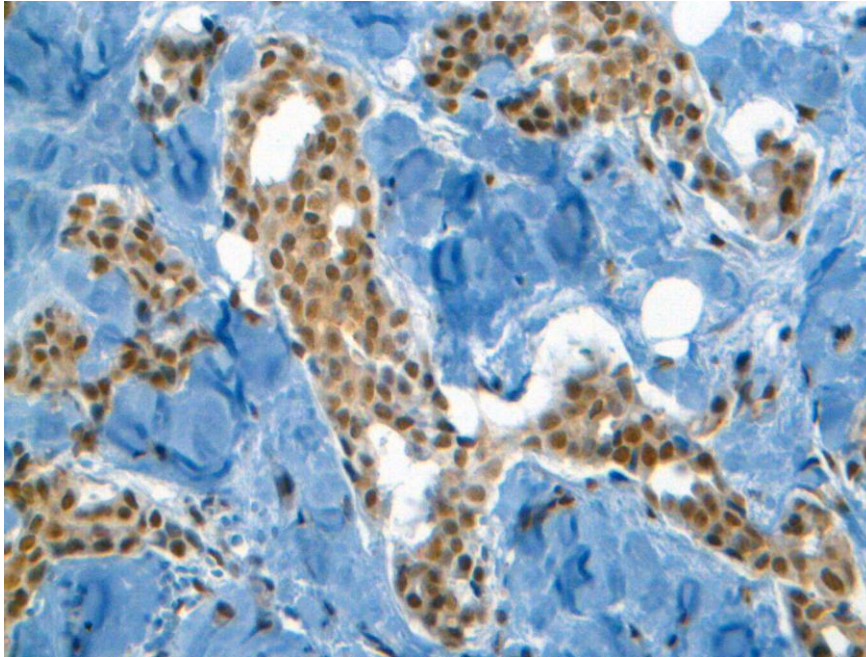


Abbildung 2: Snail im invasiven Mamma Karzinom in der Tumorperipherie, Vergrößerung: 400fach.

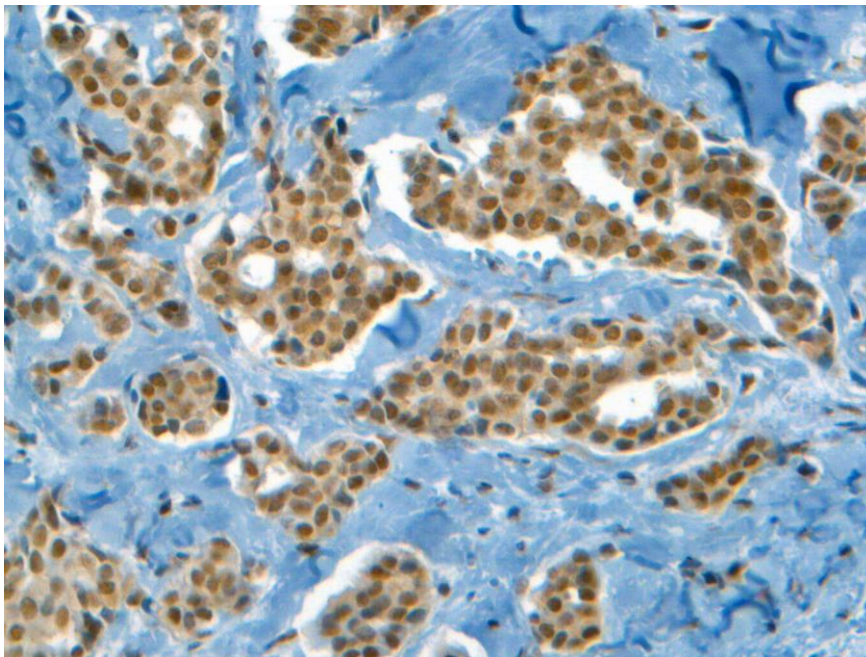


Abbildung 3: Snail im invasiven Mamma Karzinom im Tumorzentrum, Vergrößerung: 400fach.

Zeb 1 hingegen, das im epithelialen Normalgewebe nicht zu finden ist, konnte in einem Patientenfall (1/31) nachgewiesen werden. In allen anderen Fällen wurden nur die Zellkerne des umliegenden Stromagewebes positiv angefärbt und konnten damit als interne

Positivkontrolle genutzt werden. Dies zeigt die **Abbildung 4**. Der für Zeb1 positive Tumor gehörte zu der Gruppe der Fälle ohne Rezidiv. Das Präparat zeigte eine homogene Verteilung der Positivität für Zeb1 für innen und außen des Tumors.

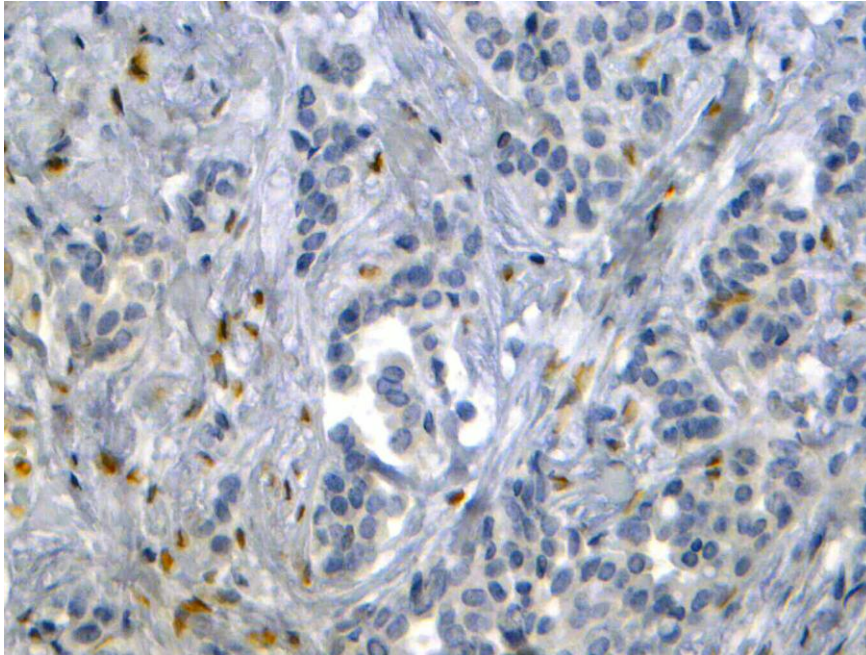


Abbildung 4: Zeb1 im invasiven Mamma Karzinom, Tumorperipherie. Diese Abbildung zeigt exemplarisch einen Zeb1 negativen Tumor mit umliegenden positiven Zeb1 Stromazellen. Vergrößerung: 400fach.

Slug konnte in insgesamt 15,4% (8/52) der Proben als positiv gefärbt gewertet werden. Wie auch in **Abbildung 5** dargestellt, machten die positiv angefärbten Zellen meist weniger als 25% je Präparat aus. Die Verteilung von Slug im invasiven Mammakarzinom war gleichmäßig in Bezug auf das Tumorzentrum und die Tumorperipherie des Präparates ($p=0,4583$). Das Vorkommen von Slug- positiven- Zellen unterschied sich nicht zwischen den Gruppen mit und ohne Rezidiv ($p=1,000$).

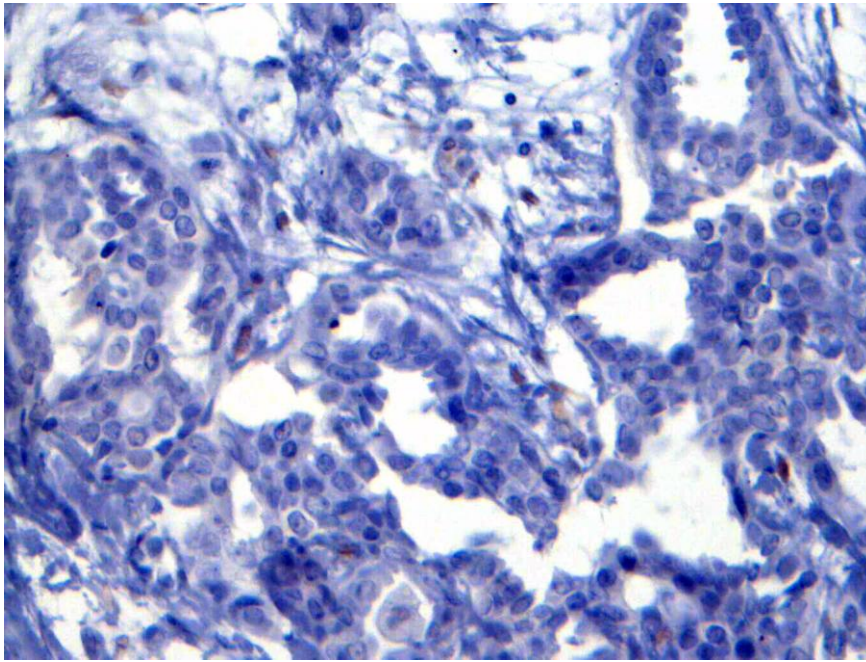


Abbildung 5: Slug im invasiven Mammakarzinom, Tumorperipherie. Nur eine sehr geringe Anzahl an Tumorzellen zeigt eine positive Slug- Färbung. Vergrößerung: 400fach.

In 12 von 46 auswertbaren Proben (26,1%) wurde Twist in den Zellkernen positiv angefärbt, wobei maximal 50% der Zellen in einem Präparat positiv waren (**Abbildung 6**). Es trat eine zytoplasmatische Hintergrundfärbung auf. Die Expression des Transkriptionsfaktors Twist unterschied sich nicht zwischen Tumorzentrum und Tumorperipherie ($p=1,000$). Hingegen kam Twist vermehrt in der rezidivfreien Gruppe vor (35,7%) im Vergleich zu den Fällen mit Rezidiv (11,1%), wobei dieser Unterschied allerdings nicht statistisch signifikant war ($p=0,0899$).

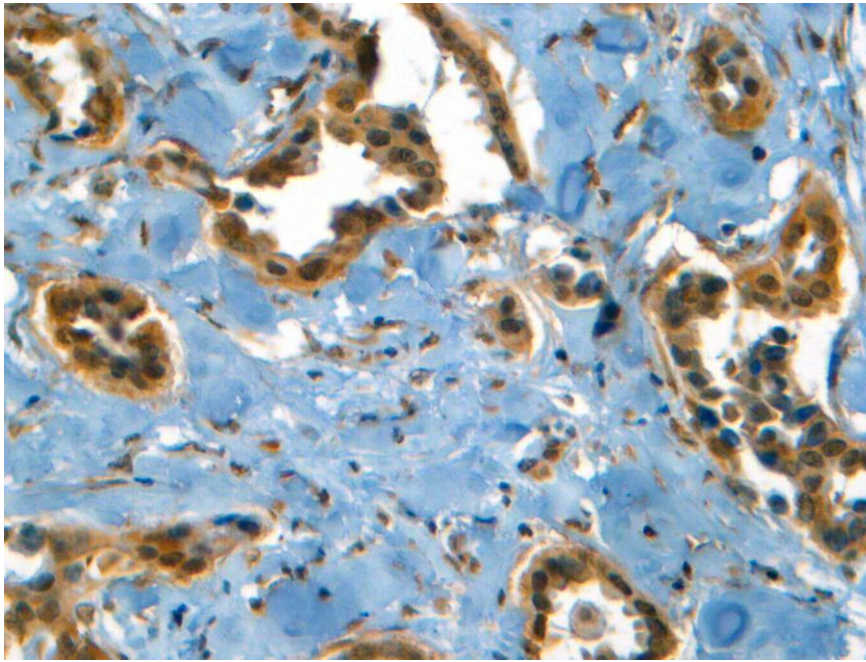


Abbildung 6: Twist im invasiven Mammakarzinom, Tumorzentrum, Vergrößerung: 400fach.

Das DCIS war negativ für Zeb1 und positiv für Twist, Snail und Slug. Auch hier war die Verteilung bei positiver Expression homogen (vergleiche **Abbildung 7**).

Der EMT-Marker FoxC2 wurde auf Gewebeproben von Kolonkarzinom, Mammakarzinom und zudem auf embryonalem Gewebe, die vom Hersteller angegebene Positivkontrolle des Markers, getestet. Auch in verschiedenen Antikörperkonzentrationen und pH-Werten bei der Demaskierung wies er in keiner der getesteten immunhistochemischen Färbung eine Positivität auf. Die höchste getestete Konzentration des Antikörpers lag bei 1:10. FoxC2 konnte somit nicht gewertet werden.

Die vollständige Auswertung der immunhistochemischen Färbung der EMT-Marker kann den **Tabellen 7 und 8** entnommen werden. Einige Fälle konnten nicht gewertet werden, wenn nach mehrfachen Färbeversuchen stets zu wenig Gewebematerial auf den TMAs zurückblieb. Wie auch in **Tabelle 6** beschrieben, wurden die EMT-Marker über einen Score ausgewertet, wobei Score 0 als negative Färbung und Score1-4 als positive Färbung gewertet wurde.

	alle Präparate (n=62)	Rezidiv- Gruppe (n=26)	Rezidiv-freie Gruppe (n=36)	p-Wert (Rezidiv vs. rezidivfrei)
Slug	8/52 (15.4%)	4/23 (17.4%)	4/29 (13.8%)	p=1.000
Snail	57/57 (100%)	25/25 (100%)	32/32 (100%)	p=n.s.
Twist	12/46 (26.1%)	2/18 (11.1%)	10/28 (35.7%)	p=0.0899
Zeb1	2/57 (3.5%)	0/24 (0%)	2/33 (6.1%)	p=0.5038

Tabelle 7: Färbeergebnisse der EMT- Marker in der Immunhistochemie. In den Spalten sind mit „n“ die insgesamt getesteten Fälle benannt. Angegeben sind in der Tabelle die positiv angefärbten Fälle gegen die insgesamt auswertbaren Fälle dieser Kategorie und in Klammern die positiven Fälle in prozentualer Angabe. Es werden neben den Ergebnissen für alle Präparate die Ergebnisse in die Untergruppen der untersuchten Kohorten, Rezidiv- beziehungsweise rezidivfreie Gruppe, unterteilt und verglichen.

	Tumor- zentrum (n=31)	Tumorrand (n=31)	p-Wert (Zentrum vs. Rand)	Normales Gewebe (n=4)
Slug	5/25 (20.0%)	3/27 (11.1%)	p= 0.4583	3/3 (100%)
Snail	27/27 (100%)	30/30 (100%)	n.s.	4/4 (100%)
Twist	6/22 (27.3%)	6/24 (25.0%)	p=1.000	4/4 (100%)
Zeb1	1/29 (3.4%)	1/28 (3.6%)	p=1.000	0/4 (0%)

Tabelle 8: Färbeergebnisse der EMT- Marker in der Immunhistochemie. In den Spalten sind mit „n“ die insgesamt getesteten Fälle benannt. Angegeben sind in der Tabelle die positiv angefärbten Fälle gegen die insgesamt auswertbaren Fälle dieser Kategorie und in Klammern die positiven Fälle in prozentualer Angabe. Die Tabelle zeigt die Unterteilung und den Vergleich der Ergebnisse der EMT-Marker Färbung im Tumorzentrum und der Tumorperipherie. Zum Vergleich die Ergebnisse der gleichen Marker im normalen Mammagewebe.

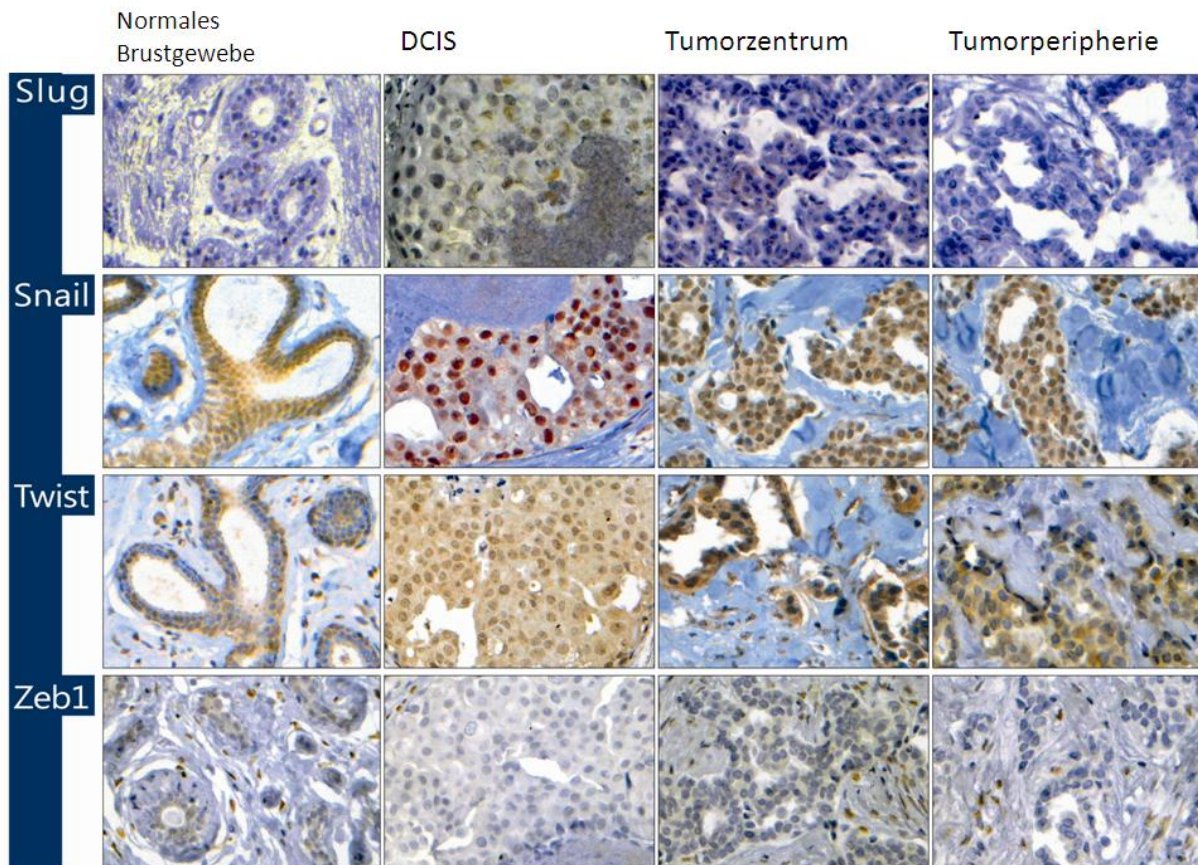


Abbildung 7: Übersicht der immunhistochemischen Färbungen der EMT-Marker Snail, Slug, Twist und Zeb1 im Normalgewebe, DCIS und invasivem Tumor. Der invasive Tumor ist hier separat als Tumorzentrum und Tumorperipherie zu sehen. Als positive Färbung wurden die positiven Kernfärbungen der Mammakarzinomzellen beziehungsweise der Zellen des DCIS oder des gesunden Mammagewebes gewertet. Die Positivität wurde mit dem beschriebenen Score eingeteilt. Auffallend ist die starke Positivität des EMT-Markers Snail in fast allen getesteten Geweben und hingegen die nur gering vorhandene Anfärbung des Markers Zeb1. Vergrößerung: 400fach.

3.3. Darstellung, Vorkommen und Verteilung der lymphatischen Zellen im Brustdrüsen-Normalgewebe, im DCIS und im invasiven Tumor

T- und B- Zellen wurden mittels Immunhistochemie dargestellt. Durch die im kompletten Querschnitt fixierten Tumoren auf je einem Objektträger konnten im Gegensatz zur Durchflusszytometrie die lymphatischen Zellen nicht nur quantitativ bestimmt werden, sondern auch ihre Verteilung im und um den Tumor dargestellt werden. Die Invasion von verschiedenen lymphatischen Zellen in Tumorgewebe wurde analysiert.

Lymphatischen Zellen ließen sich mit Hilfe der Färbung sowohl im normalen Brustdrüsengewebe, im DCIS als auch im invasiven Tumor darstellen. Eine quantitative

Auswertung und Analyse zur Verteilung der lymphatischen Zellen wurde nur für das invasive Karzinom durchgeführt. Repräsentative Bilder sind in **Abbildung 13** zusammengestellt. Insgesamt waren sowohl CD20 positive Zellen als auch FoxP3 positive Zellen sehr selten im Tumor, DCIS und Normalgewebe zu detektieren, sodass es nicht möglich war in allen Bildern der **Abbildung 13** mindestens eine positiv angefärbte Zelle zu zeigen.

Im invasiven Tumor war eine Invasion der B- Lymphozyten in die Tumornester nachweisbar. 0,15% der Zellen im Tumornest wurden durch den Oberflächenmarker CD20 als B- Lymphozyten identifiziert (**Abbildung 8**).

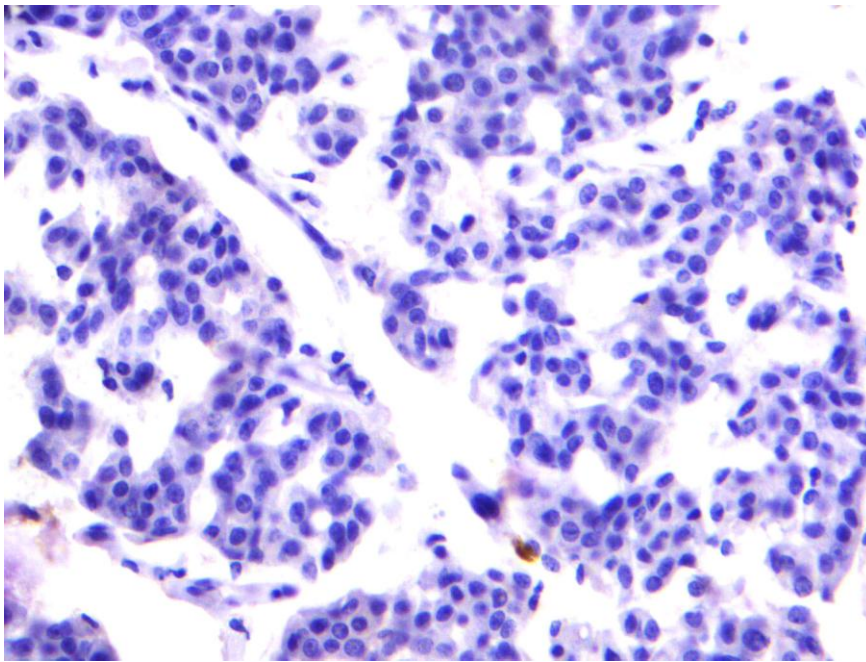


Abbildung 8: CD20 im invasiven Mammakarzinom, Tumorzentrum. Vergrößerung: 400fach.

Hingegen konnten 3,78% der Zellen durch eine positive CD3 Darstellung als T- Zellen erfasst werden (**Abbildung 9**).

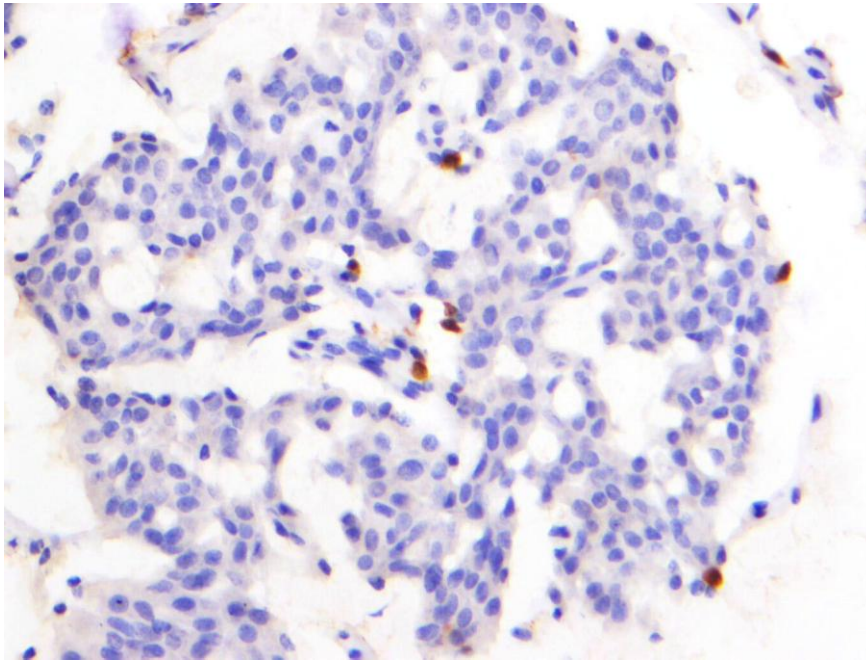


Abbildung 9: CD3 im invasiven Mammakarzinom, Tumorzentrum. Vergrößerung: 400fach.

Aber weder die Verteilung der B- noch der T- Zellen zeigte einen signifikanten Unterschied, wenn man das Vorkommen im Tumorzentrum mit dem des Tumorrandes vergleicht (CD20 p-Wert: 0,0706; CD3 p- Wert: 0,1453). Bei dem Vergleich des quantitativen Vorkommens bezüglich innen und außen im Tumor konnte im gepaarten T- Test ebenfalls kein signifikanter Verteilungsunterschied für die zytotoxischen und die regulatorischen T-Lymphozyten nachgewiesen werden (CD8 p-Wert: 0,0768; FoxP3 p-Wert: 0,1602). Exemplarische Bilder der Färbungen für CD8 und FoxP3 im invasiven Mammakarzinom werden in den **Abbildungen 10 und 11** gezeigt.

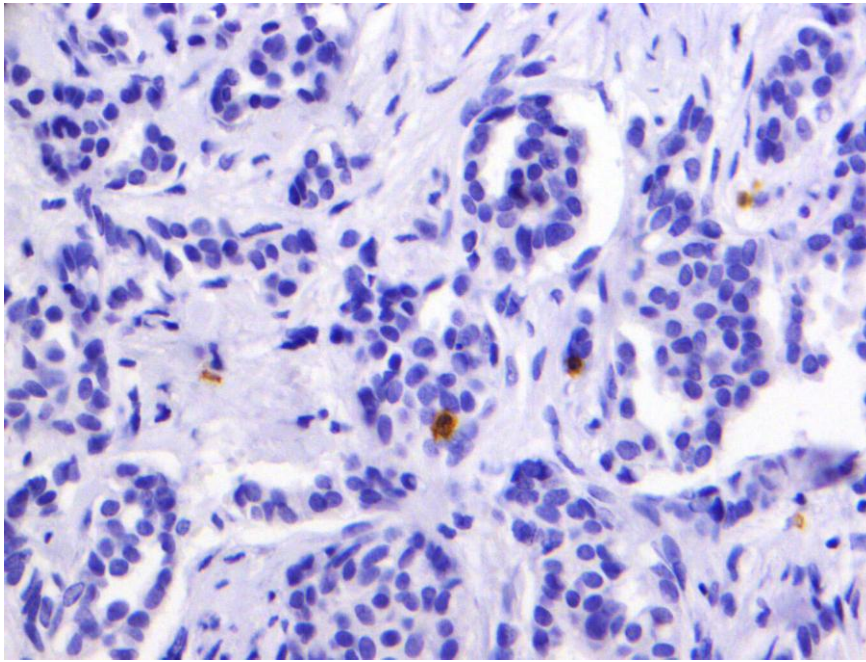


Abbildung 10: CD 8 im invasiven Mammakarzinom, Tumorzentrum. Vergrößerung: 400fach.

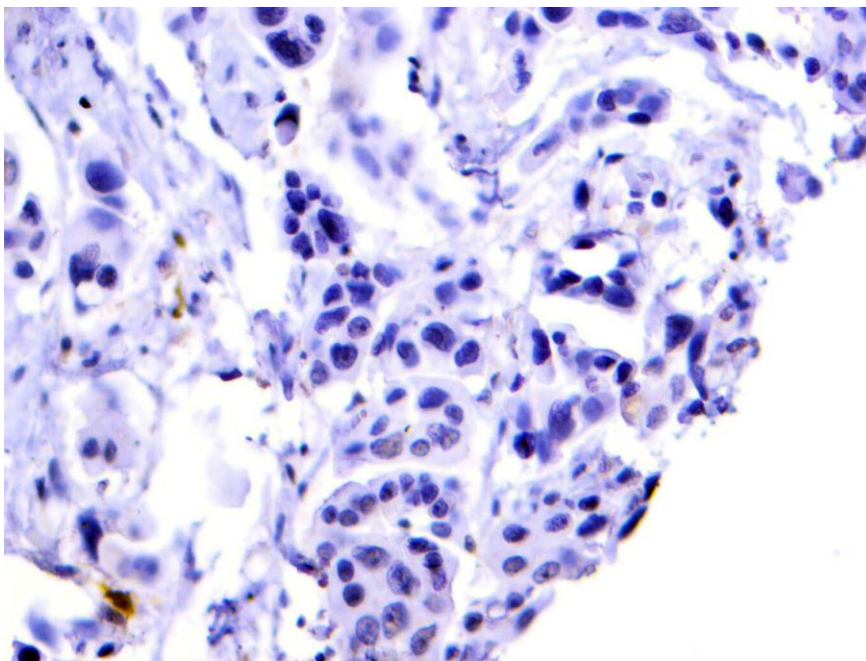


Abbildung 11: FoxP3 im invasiven Mammakarzinom, Tumorzentrum. Vergrößerung: 400fach.

Der Vergleich zwischen der Tumorgruppe mit späterem Rezidiv und ohne Rezidiv zeigte eine homogene Verteilung der lymphatischen Zellen im Tumor. Es gab für keinen untersuchten Oberflächenmarker einen statistisch signifikanten Unterschied in diesem Vergleich (p- Werte: CD3: 0,9063; CD8: 0,1873; CD20: 0,3242; FoxP3: 0,7875). Auch die mit Ki67 untersuchte Proliferationsrate war für das Tumorzentrum im Vergleich zum Tumorrand fast identisch. Der p- Wert dieses Vergleiches wurde mit $p = 0,9293$ berechnet. Die Proliferationsrate differierte

nicht zwischen den Tumoren mit späterem Rezidiv in der Nachbeobachtungszeit der Patientinnen und den Tumoren ohne Rezidiv (p-Wert: 0,9142). Ein repräsentativer Ausschnitt einer Ki67 Färbung an einem Tumorzentrum des invasiven Mammakarzinoms ist in **Abbildung 12** dargestellt.

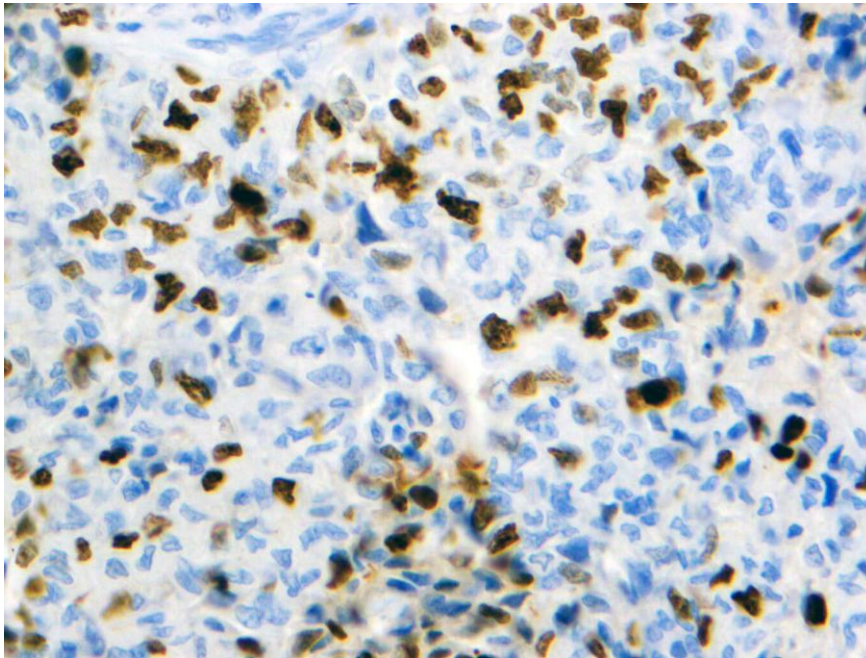


Abbildung 12: Ki67 im invasiven Mammakarzinom, Tumorzentrum. Vergrößerung: 400fach.

Die Häufigkeit der Expression und die Verteilung sind zusammenfassend in **Tabelle 9** dargestellt.

Arithmetischer Mittelwert in Prozent (%)	Untergruppe	CD3	CD8	CD20	FoxP3	Ki67
Invasives Mammakarzinom	Alle (n=62)	3,78	1,58	0,15	0,55	11,77
	Rezidivgruppe (n=26)	3,63	1,06	0,1	0,59	12,46
	Gruppe ohne Rezidiv (n=36)	3,88	1,99	0,18	0,52	11,31
	Tumorrand (n=31)	4,26	1,82	0,07	0,69	10,84
	Tumorzentrum (n=31)	3,26	1,27	0,23	0,38	12,81

Tabelle 9: Häufigkeit der verschiedenen lymphatischen Zellen in Prozent im invasiven Mammakarzinom.

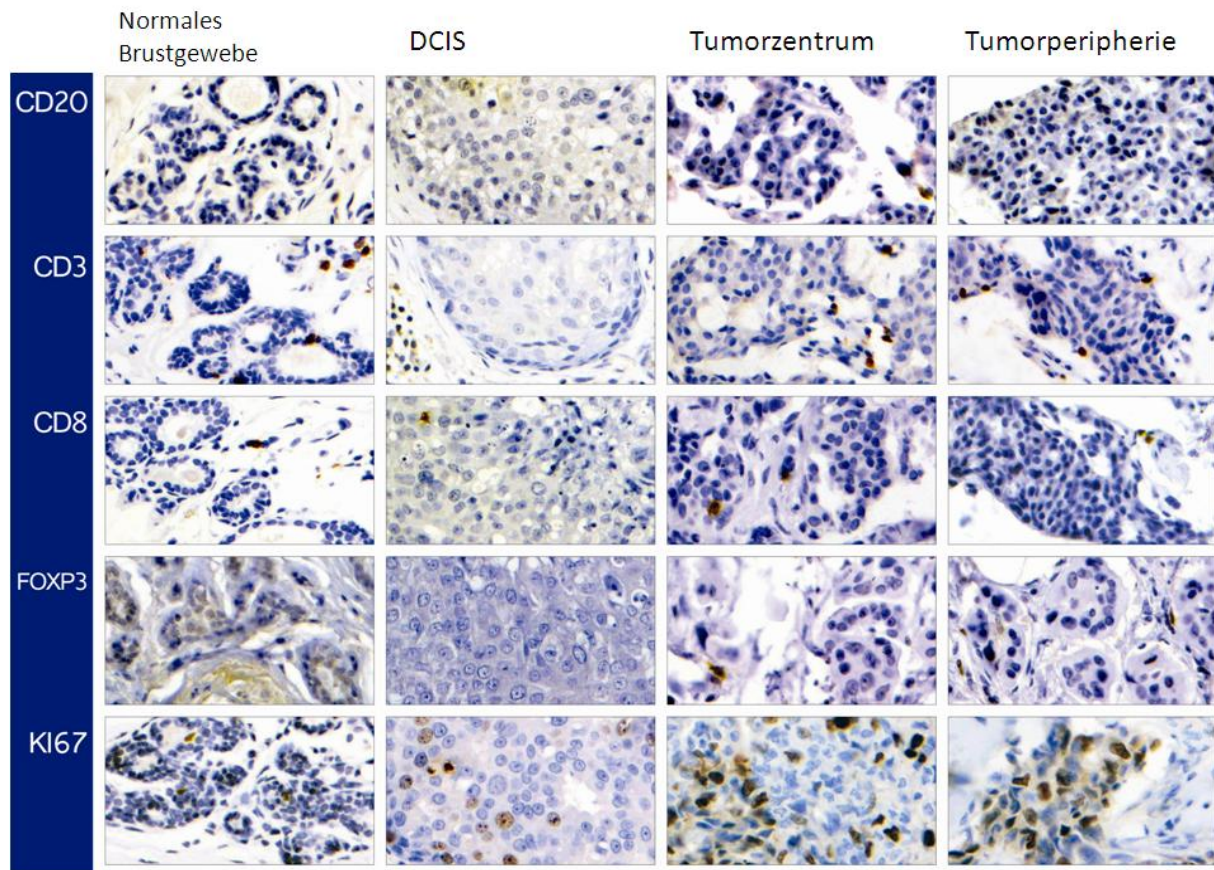


Abbildung 13: Übersicht der immunhistochemischen Färbungen der lymphatischen- Marker CD20, CD3, CD8, FoxP3 und dem Proliferationsmarker Ki67 im Normalgewebe, DCIS und invasivem Tumor. Der invasive Tumor ist hier separat als Tumorzentrum und Tumorperipherie zu sehen. Aufgrund des teils geringen Vorkommens der lymphatischen Zellen im Tumorverband konnten hier nicht immer Bilder mit positiven Anfärbungen der lymphatischen Marker im Tumornest gezeigt werden. Vergrößerung: 400fach.

3.4. Darstellung, Vorkommen und Verteilung der Tumorstammzellen im Brustdrüsen-Normalgewebe, im DCIS und im invasiven Tumor

Zur Darstellung der Tumorstammzellen in der Immunfluoreszenzfärbung wurden Mehrfachkombinationsfärbungen genutzt. Neben der Anfärbung der Zellkerne mit DAPI und der Markierung der epithelialen Zellen mittels eines Antikörpers gegen CK7, wurden Antikörperkombinationen aus je zwei Antikörpern gegen Oberflächenmarker verwendet. Die potentiellen Stammzellen sollten CD44 exprimieren, während sich CD24 nicht nachweisen lässt ($CD44^{+}/CD24^{-}$) (Al-Hajj 2003). Ebenfalls sollten sich potentielle Stammzellen durch die zweifach positive Anfärbung der Marker CD49f und CD24 darstellen lassen ($CD49f^{+}/CD24^{+}$) (Vassilopoulos, Wang et al. 2008). Diese kombinierten Färbungen wurden auf den zuvor beschriebenen TMA's mit dem invasiven Tumor und DCIS Arealen, sowie auf Normalgewebe

durchgeführt. Die manuell ausgezählten CK7 positiven epithelialen Zellen wurden als 100% festgesetzt und die Expression der Oberflächenmarker wurden damit in ein prozentuales Verhältnis gesetzt. Es wurden im Median im invasiven Tumor 95 epitheliale Zellen pro ausgewertete Färbung gezählt (mit einem Schwankungsbereich von gezählten Zellen zwischen 23-331). Im DCIS wurden 179 CK7 positive Zellen im Median ausgewertet (Schwankungsbereich: 101-538 Zellen). In den Fällen mit invasivem Mammakarzinom konnte im Mittel eine CD44 Expression von 20,46% ermittelt werden. Der Oberflächenmarker CD24 wurde in beiden Antikörperkombinationen detektiert. Der positive Nachweis von CD24 auf epithelialen Zellen differierte nur sehr gering je nach Färbekombination mit einem anderen Marker und lag bei 7,46% beziehungsweise bei 9,22%. CD49f, auch Integrin alpha6 genannt, konnte auf 18,40% der epithelialen Zellen nachgewiesen werden. In den Kombinationen der Marker, die potentielle Tumorstammzellen zeigen sollen, lagen im invasiven Karzinom im Mittel 18,53% Zellen vor, die CD44 positiv waren, während sie keine Expression von CD24 zeigten ($CD44^{+}/CD24^{-}$) (**Abbildung 14**).

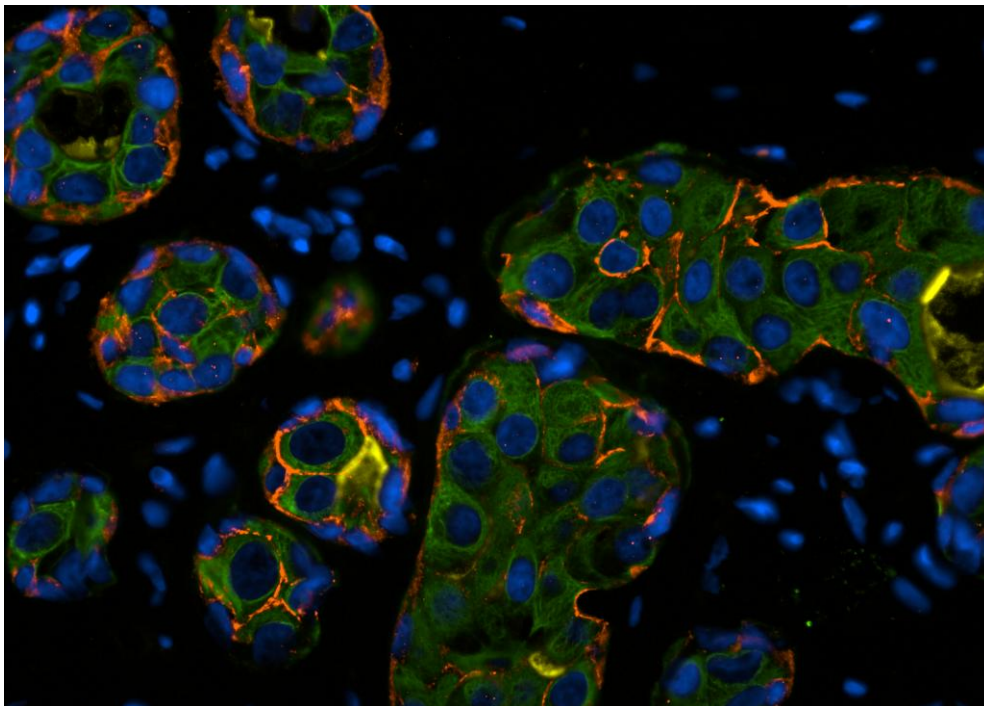


Abbildung 14: Immunfluoreszenz Mehrfachfärbungen mit DAPI (blau), Zytokeratin (grün), CD44 (rot) und CD24 (gelb). CD44/CD24 im invasiven Mammakarzinom. Man beachte in dieser Abbildung die Menge an $CD44^{+}/CD24^{-}$ Zellen und die luminal betonte Färbung von CD24. Vergrößerung: 400fach.

Im Gegensatz dazu wies die Mehrfachfärbung mit CD49f und CD24, nur 2,37% an potentiellen Tumorstammzellen auf ($CD49f^{+}/CD24^{+}$) (**Abbildung 15 und 16**).

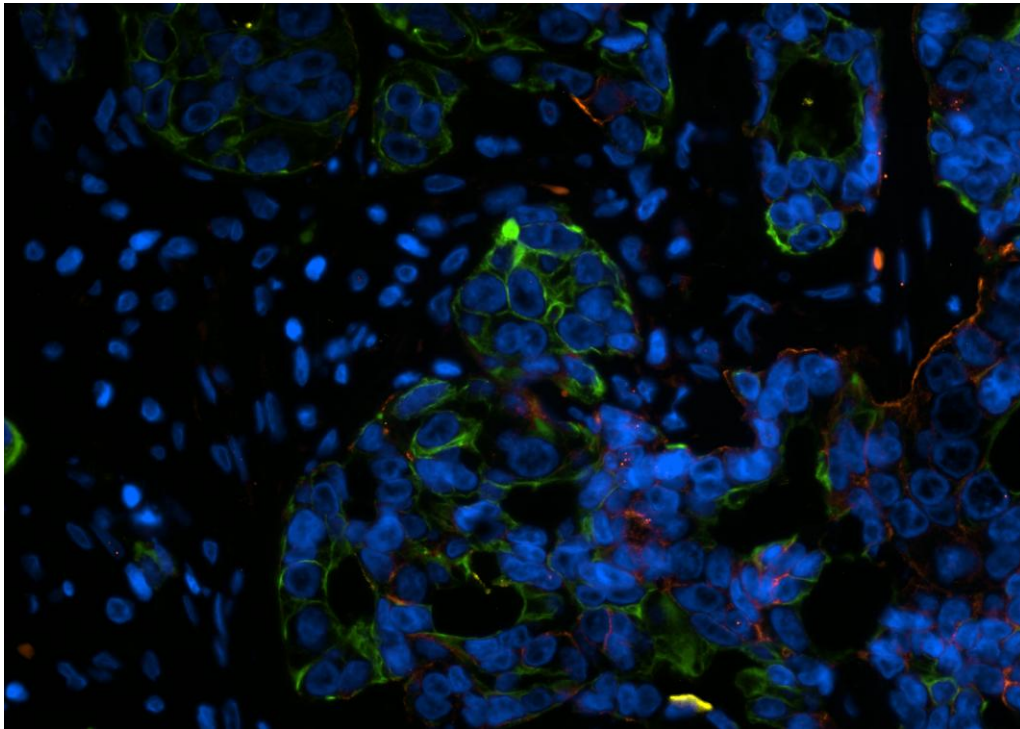


Abbildung 15: Immunfluoreszenz Mehrfachfärbungen mit DAPI (blau), Zytokeratin (grün), CD49f (rot) und CD24 (gelb). CD49f/CD24 im invasiven Mammakarzinom. Viele Bereiche hatten, wie hier abgebildet, keine Doppelt-Positivität für beide Marker. Vergrößerung: 400fach.

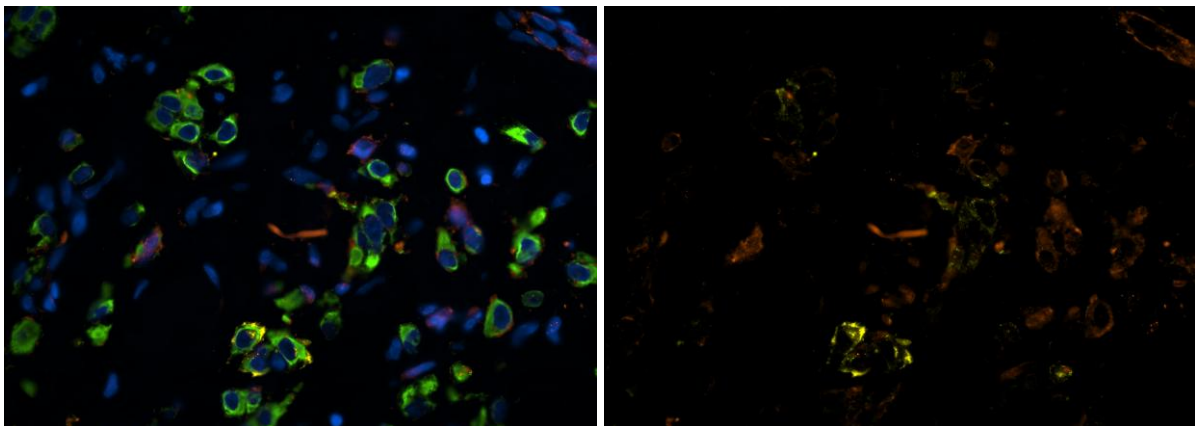


Abbildung 16: CD49f/CD24 im invasiven Mammakarzinom. Ein Beispiel für einzelne doppelt positive Zellen: potentielle Tumorstammzellen. **Links:** Immunfluoreszenz Mehrfachfärbungen mit DAPI (blau), Zytokeratin (grün), CD49f (rot) und CD24 (gelb). **Rechts:** Gleicher Bildausschnitt, nur CD49f (rot) und CD24 (gelb). Vergrößerung: 400fach.

Die unterschiedliche Anzahl der potentiellen Tumorstammzellen je nach Markerkombination ließ sich im T-Test als statistisch signifikant nachweisen mit einem p-Wert von $<0,0001$. Tumorstammzellen mit der Oberflächenmarkerkombination $CD44^{+}/CD24^{-}$ konnten in 30,11% der Zellen im DCIS nachgewiesen werden. Somit ist eine Tendenz zu erkennen, dass im

DCIS mehr Tumorstammzellen ($CD44^{+}/CD24^{-}$) zu finden sind als im invasiven Karzinom (**Abbildung 17**). Diese ist allerdings statistisch nicht signifikant ($p=0,1192$).

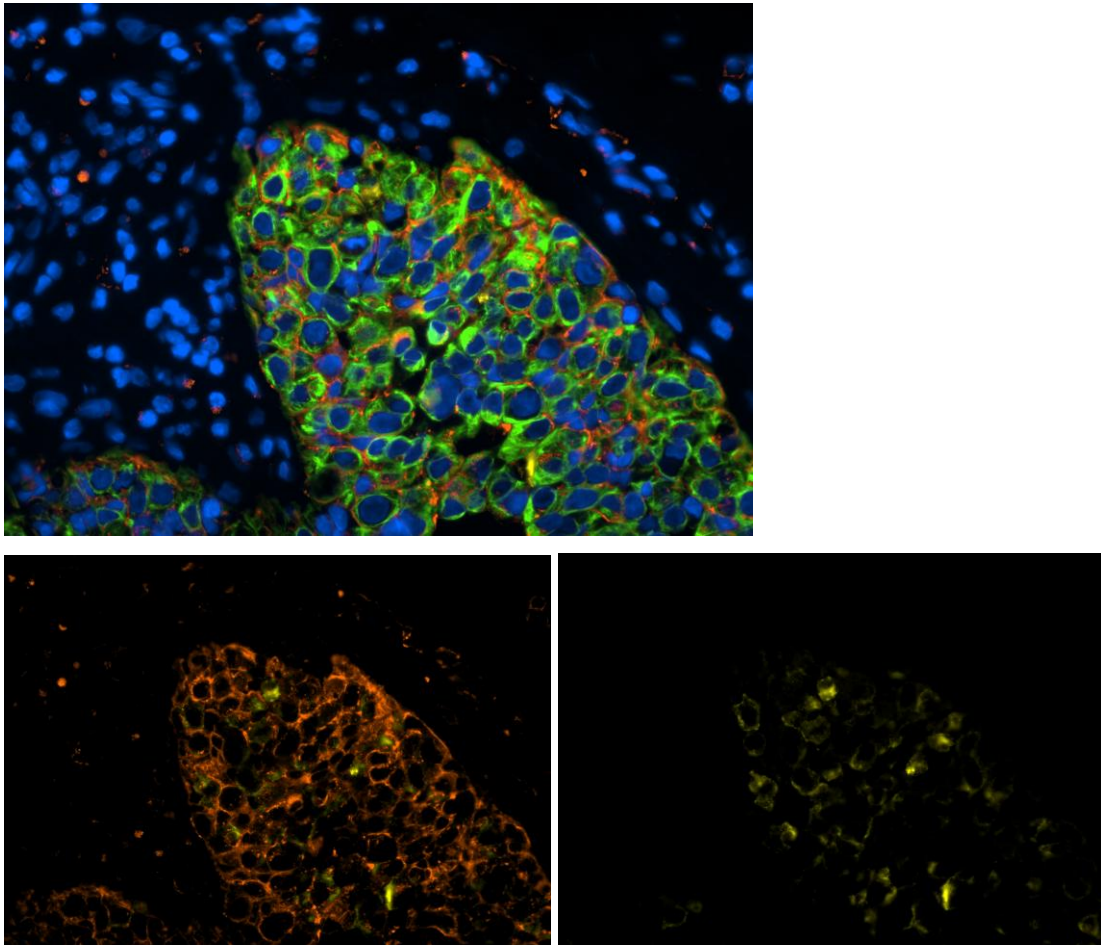


Abbildung 17: CD44/CD24 im DCIS. **Oben:** Immunfluoreszenz Mehrfachfärbungen mit DAPI (blau), Zytokeratin (grün), CD44 (rot) und CD24 (gelb). **Unten links:** Gleicher Bildausschnitt, nur CD44 (rot) und CD24 (gelb). **Unten rechts:** Gleicher Bildausschnitt, nur CD24 (gelb). Vergrößerung: 400fach.

Es ergab sich außerdem kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Tumorstammzellen. Im Vergleich zwischen dem Tumorzentrum und dem Tumorrand waren die Tumorstammzellen mit dem Expressionsmuster $CD44^{+}/CD24^{-}$ nahezu homogen verteilt ($p=0,9641$). Auch die Gegenüberstellung von Fällen mit Rezidiv in der Nachbeobachtungszeit gegen Fälle ohne Rezidiv zeigte keine signifikant abweichende Verteilung der Tumorstammzellen in diesen Gruppen ($p=0,2941$).

Die potentiellen Tumorstammzellen mit der Oberflächenmarkerkombination $CD49f^{+}/CD24^{+}$ waren im DCIS mit 1,02% sogar seltener nachzuweisen als im invasiven Karzinom (2,37%) (**Abbildung 18**).

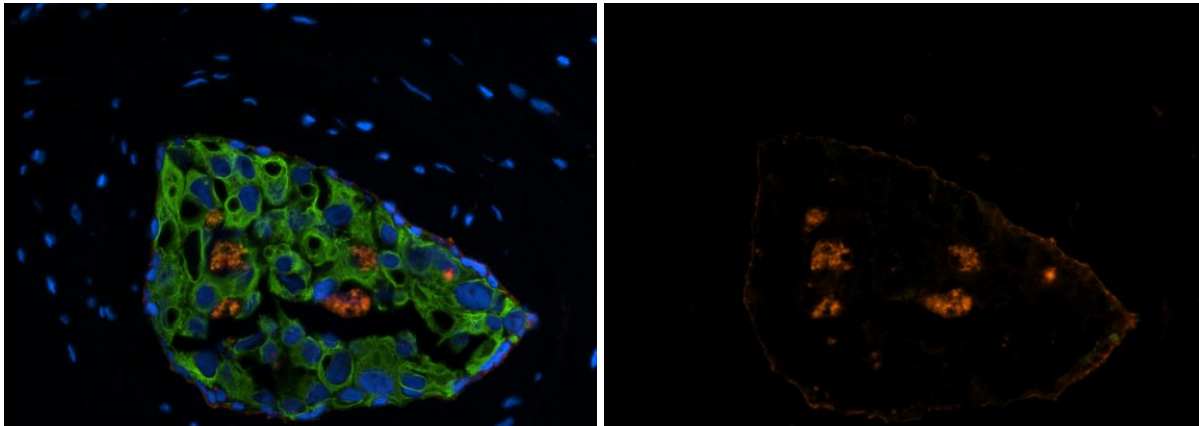


Abbildung 18: CD49f/CD24 im DCIS. Man beachte die randbetone Färbung von CD49f im DCIS.

Links: Immunfluoreszenz Mehrfachfärbungen mit DAPI (blau), Zytokeratin (grün), CD49f (rot) und CD24 (gelb). **Rechts:** Gleicher Bildausschnitt, nur CD49f (rot) und CD24 (gelb). Vergrößerung: 400fach.

Es konnte keine signifikante Differenz in der Verteilung der $CD49f^{+}/CD24^{+}$ markierten Zellen nachgewiesen werden. Der p-Wert des Vergleiches zwischen Tumorzentrum und Tumorrand liegt bei 0,2341 während der p-Wert des Vergleiches zwischen den Gruppen mit und ohne Rezidiv bei 0,9118 liegt (**Tabellen 10 und 11**).

Im Normalgewebe konnte ebenfalls in beiden Färbungskombinationen teilweise Zellen nachgewiesen werden, die die für die Tumorstammzellen typischen Oberflächenmarker aufwiesen. Typische Färbemuster des Mamma-Normalgewebes sind in **Abbildung 19 und 20** dargestellt.

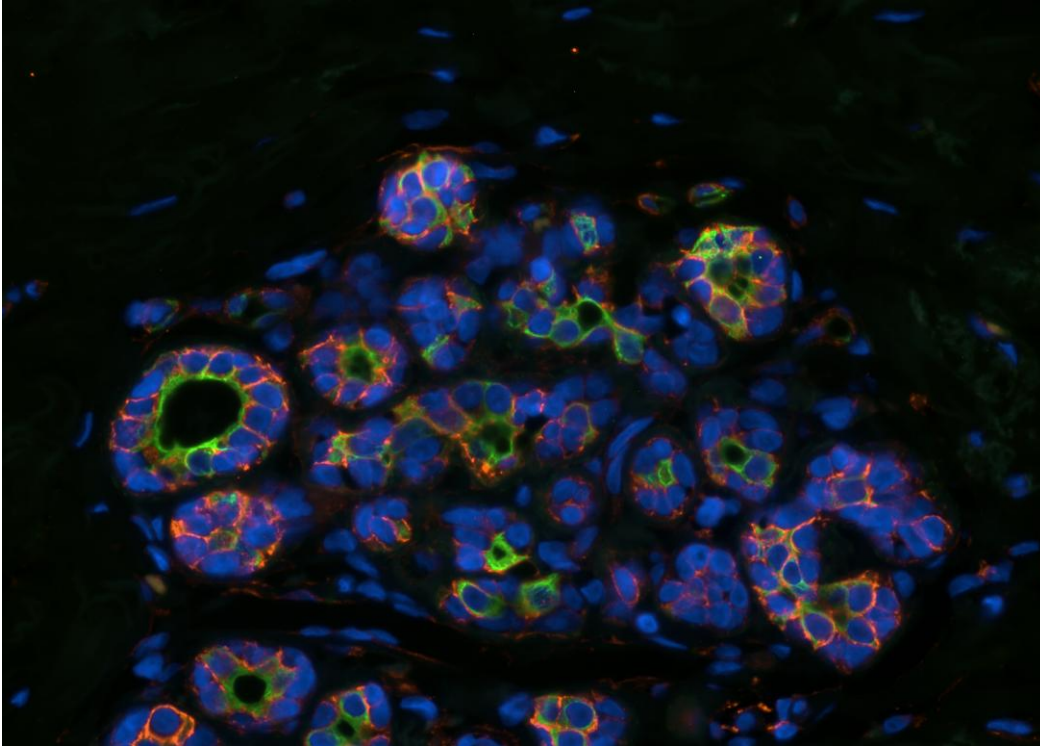


Abbildung 19: CD44/CD24 im Brust-Normalgewebe. Immunfluoreszenz Mehrfachfärbungen mit DAPI (blau), Zytokeratin (grün), CD44 (rot) und CD24 (gelb). Vergrößerung: 400fach.

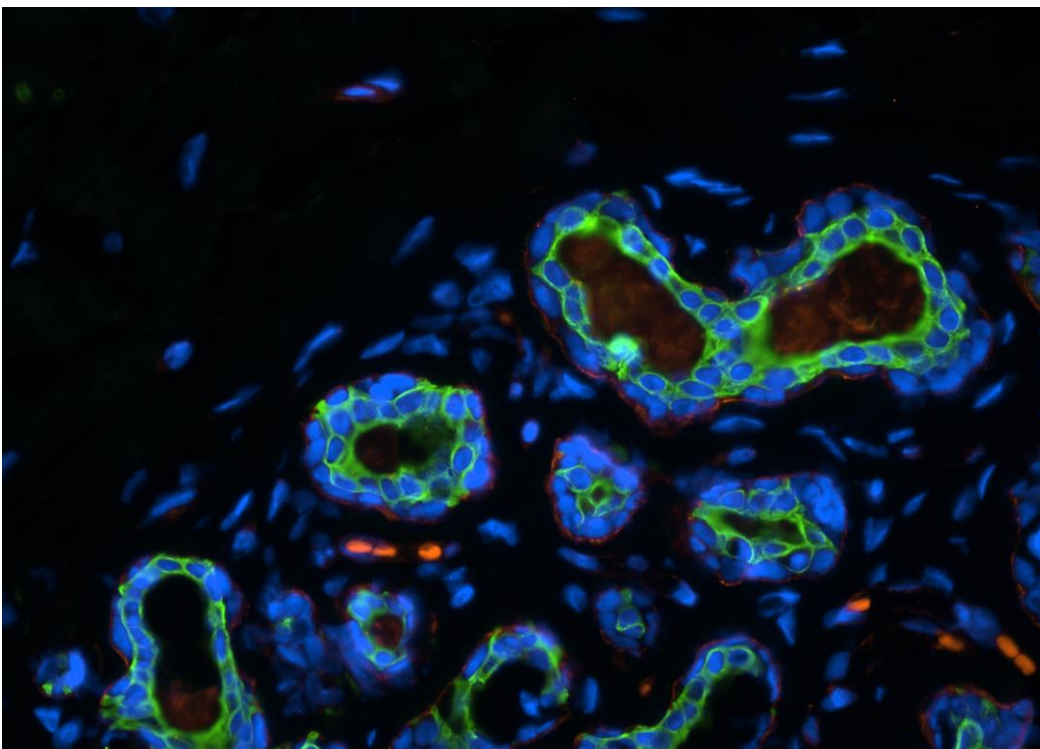


Abbildung 20: CD49f/CD24 im Brust-Normalgewebe. Immunfluoreszenz Mehrfachfärbungen mit DAPI (blau), Zytokeratin (grün), CD49f (rot) und CD24 (gelb). Vergrößerung: 400fach.

Zusätzlich zeigten sich Tumorstammzellen mit $CD44^{+}/CD24^{-}$ am häufigsten in den Außenzonen eines DCIS- Areal. Diese Beobachtung war allerdings nicht statistisch signifikant. Es fiel zudem auf, dass die CD24 Expression im benignen und malignen Mammagewebe verstärkt luminal in duktalem Strukturen auftritt (**Abbildung 14**). Eine positive CD49f Anfärbung hingegen war vermehrt in den basalen Bereichen der Dukti und den zum Stroma randbildenden Arealen des Tumors, insbesondere im DCIS, zu finden (**Abbildung 18**).

Eine weitere Beobachtung, die sich nicht statistisch erfassen ließ, betrifft die Färbung von Zytokeratin 7, welches auf epithelialen Zellen vorhanden ist und damit die Abgrenzung zu stromalen Zellen in der Immunfluoreszenz möglich macht. Im beschriebenen Untersuchungsspektrum gab es einige Fälle, in denen offensichtlich epitheliale Zellen nicht durch den CK7- Antikörper angefärbt wurden. Gerade diese Zellen, die eventuell einen CK7 Expressionsverlust anzeigten, waren häufig und stark positiv für die CD44 Färbung und die CD49f Färbung (**Abbildung 21**).

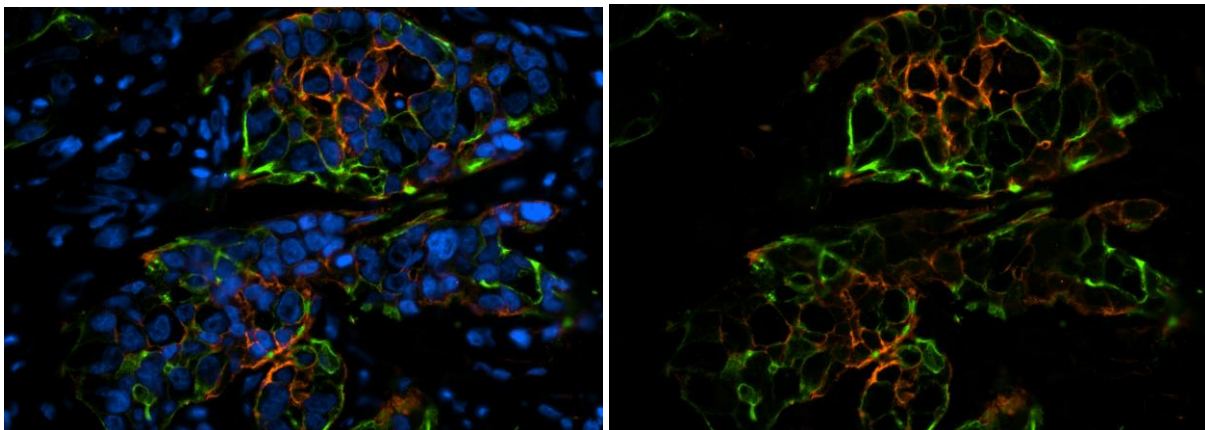


Abbildung 21: Zytokeratin-Verlust der Mammakarzinomzellen. **Links:** Immunfluoreszenz Mehrfachfärbungen mit DAPI (blau), Zytokeratin (grün), CD49f (rot) und CD24 (gelb). **Rechts:** Gleicher Bildausschnitt, nur CD49f (rot) und Zytokeratin (grün). Auffällig ist der CK7 Verlust auf epithelialen Zellen mit positiver CD49f Färbung. Vergrößerung: 400fach.

	Mittelwerte für CD44/CD24 in Prozent	CD44	CD24	Potentielle Tumorstammzellen (CD44 ⁺ /CD24 ⁻)	Anzahl der Werte	davon am Ganzschnitt bewertet
Invasives Mamma-karzinom	Gesamt	20,46	7,47	18,53	57	8
	Fälle mit Rezidiv	17,25	10,72	15,43	25	3
	Fälle ohne Rezidiv	22,98	4,92	20,95	32	5
	Tumorrand	20,65	9,57	18,41	27	4
	Tumorzentrum	20,30	5,58	18,64	30	4
DCIS	Gesamt DCIS	34,60	11,50	30,11	10	3
	Fälle mit Rezidiv	46,79	17,39	41,54	4	1
	Fälle ohne Rezidiv	26,47	7,57	22,50	6	2
	außen DCIS	39,21	3,32	36,86	5	1
	innen DCIS	29,99	19,67	23,37	5	2

Tabelle 10: Mittelwerte in Prozent für eine positive Expression auf epithelialen Zellen für CD44 und CD24 und für den Immunophänotyp CD44⁺/CD24⁻.

	Mittelwerte für CD49f/CD24 in Prozent	CD49f	CD24	Doppelt positiv (CD49f ⁺ /CD24 ⁺) = potentielle Tumorstammzellen	Anzahl der Werte	davon am Ganzschnitt bewertet
Invasives Mamma-karzinom	Gesamt	18,40	9,22	2,37	57	9
	Fälle mit Rezidiv	13,70	11,74	2,22	25	3
	Fälle ohne Rezidiv	22,07	7,25	2,49	32	6
	Tumorrand	18,91	9,00	0,91	28	5
	Tumorzentrum	17,91	9,43	3,78	29	4
DCIS	Gesamt DCIS	10,31	6,70	1,02	11	4
	Fälle mit Rezidiv	19,20	9,01	2,25	5	2
	Fälle ohne Rezidiv	2,90	4,77	0,00	6	2
	außen DCIS	6,35	7,12	0,46	6	2
	innen DCIS	15,06	6,19	1,70	5	2

Tabelle 11: Mittelwerte in Prozent für eine positive Expression auf epithelialen Zellen für CD49f und CD24 und für den Immunophänotyp CD49f⁺/CD24⁺.

4. Diskussion

Die EMT, ein Prozess, bei dem epitheliale Zellen mesenchymale Eigenschaften annehmen, ist nach Ergebnissen vorheriger Studien mit erhöhter Invasivität verbunden (Mani, Guo et al. 2008). Der im Nukleus aktive Transkriptionsfaktor Snail ist ein Zink-Finger Protein und ein Repressor für das Adhäsionsprotein E-Cadherin (Vincent, Neve et al. 2009; Neal, Henderson et al. 2012). Die temporäre Regulierung von E-Cadherin durch Transkriptionsfaktoren wie Snail, Slug, Twist und auch Zeb1 ist ein wichtiger Schritt zur Umwandlung in eine Zelle, die epitheliale Eigenschaften verliert und mesenchymale Eigenschaften gewinnt (Makdissi, Machado et al. 2009). Somit könnten die hier untersuchten Transkriptionsfaktoren als Marker für den Prozess der EMT angesehen werden (Behnsawy, Miyake et al. 2012). Die Annahme, dass die EMT- Marker eine vermehrte Positivität im invasiven Tumor gegenüber dem Normalgewebe aufweisen, konnte nicht bestätigt werden. Die Expressionsrate war im hier vorliegenden Untersuchungsgut gleich, wie bei Snail, oder sogar niedriger im Tumorgewebe als im physiologischen Brustgewebe, wie bei Twist und Slug. Die starke Expression von Slug und Twist in nicht malignen Mammaepithelzellen wurde auch schon von anderen Autoren beschrieben (Come, Magnino et al. 2006; Gort, Suijkerbuijk et al. 2008).

Snail ließ sich in 100% der Fälle nachweisen. Meist waren sogar mehr als 75% der Zellen positiv für eine Snail Expression. Aufgrund dieser starken und ubiquitären Positivität konnte kein Unterschied in der Expression zwischen Tumorperipherie und Tumorzentrum nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten vorherige Studien eine besonders starke Snail- Expression der Tumorzellen, die sich in der Nähe zu Stromazellen befanden (Wever, Pauwels et al. 2008; Vincent, Neve et al. 2009). Die Snail Expressionsrate lag bei Geradts et al. bei 24% und bei Soini et al. nur bei 3,1% der getesteten Fälle (Geradts, de Herreros et al. 2011; Soini, Tuhkanen et al. 2011). Diese große Diskrepanz kann eventuell durch die Verwendung von Antikörpern unterschiedlicher Hersteller erklärt werden. Insbesondere ist zu erwähnen, dass nach Abschluss der hier vorgestellten Versuche der Hersteller „Abcam“ veröffentlichte, dass der Snail- Antikörper, der in dieser Studie verwendet wurde, eine Kreuzreaktivität zu Slug hat. Die Slug-Expression, die mit dem Anti-Slug Antikörper detektiert wurde, war in dem vorliegenden Untersuchungsgut viel geringer mit nur 15,4% positiven Fällen, dass diese Kreuzreaktivität alleine die hohe Snail Expression nicht erklärt. Die großen Unterschiede in der Expressionsrate von Snail der verschiedenen Arbeitsgruppen

zeigen aber auch, dass es, um Snail als diagnostischen Marker einzusetzen, weiterer evaluierender Studien bedarf, die insbesondere die Antikörper auf ihrer Spezifität untersuchen sollten. Snail ist auch im Vergleich zwischen Tumorproben von Patienten mit Rezidiv zu Patienten ohne Rezidiv homogen verteilt. Es konnte dementsprechend, wie auch von anderen Autoren beschrieben, keine Assoziation zum klinischen Verlauf gefunden werden (Makdissi, Machado et al. 2009; Geradts, de Herreros et al. 2011). Drasin et al. hingegen beschreiben eine erhöhte Rezidivrate bei hoher Snail-Expression (Drasin DJ 2011).

Auch in Bezug auf die anderen Transkriptionsfaktoren differieren die quantitativen Auswertungen der Expressionsraten in der aktuellen Literatur stark. Zudem wird meist nur auf die Anzahl der insgesamt als positiv gewerteten Fälle eingegangen, nicht aber auf die Anzahl der positiven Zellen im Tumor. Den Transkriptionsfaktor Twist konnte in der vorliegenden Studie in 26,1% der invasiven Karzinome nachgewiesen werden. Soini et al. hingegen postulieren, dass nur 3,6% ihrer ausgewerteten Fälle eine Twist-Expression aufweisen, während Vesuna et al., wenn auch mit einer anderen Methodik, eine vermehrte Expression von Twist in über 60% der invasiven Mammakarzinome finden (Vesuna, van Diest et al. 2008; Soini, Tuhkanen et al. 2011). Trotz der niedrigen Expressionsrate konnten Soini et al. im Gegensatz zu dieser Studie eine Assoziation von der Expression des Transkriptionsfaktors Twist zu einem schlechteren klinischen Verlauf für die Patientinnen feststellen.

Die detektierte Expressionsrate von Slug war mit 15,6% der Fälle von invasivem Mammakarzinom niedriger als die Ergebnisse der Slug-Expressionsraten mit 34% der untersuchten Fälle von Prasad et al. (Prasad, Rath et al. 2009).

Die Expression des Transkriptionsfaktors Zeb1, welcher im Kolonkarzinom eine Bedeutung hat (Schmalhofer, Brabletz et al. 2009), konnte entsprechend der aktuellen Literatur im Brustdrüsengewebe nicht und im Mammakarzinom in nur 1 Patientenfall nachgewiesen werden (Soini, Tuhkanen et al. 2011). Soini et al. beschreiben ebenfalls die in diesen Untersuchungen auffällige Anfärbung der Zellkerne der Stromazellen.

Die Expressionsraten der Transkriptionsfaktoren Zeb1 und Twist in DCIS sind analog zu vorherigen Veröffentlichungen. Zeb1 ist auch im DCIS nicht exprimiert, während Twist auch im DCIS Positivität aufweist (Geradts, de Herreros et al. 2011).

Der EMT- Transkriptionsfaktor FoxC2, der ebenfalls für Brustkrebs, insbesondere in Bezug auf die Metastasierung, eine Bedeutung haben soll, konnte aufgrund fehlender Antikörperreaktivität nicht nachgewiesen werden (Mani, Yang et al. 2007).

Zusammenfassend konnte keine intratumorale Heterogenität der EMT- Marker im invasiven Mammakarzinom nachgewiesen werden. Nassar et al. gelang es ebenfalls nicht für E-Cadherin eine intratumorale Heterogenität festzustellen. Sie hinterfragten das Phänomen der Heterogenität sogar, indem sie die Frage aufwarfen, ob intratumorale Heterogenität tatsächlich die wahre Biologie des Tumors widerspiegelt oder nur durch technische Ungenauigkeiten zustande kommt (Nassar, Radhakrishnan et al. 2010). Micalizzi et al., die zwar das Prinzip der intratumorale Heterogenität unterstützen, ergänzten die Theorie der EMT um die Idee der „Kollektive Migration“, bei der mehrere Zellen noch im Verbund sich vom Primärtumor lösen und migrieren können (Micalizzi, Farabaugh et al. 2010).

Die in dieser Studie getesteten Transkriptionsfaktoren repräsentieren aufgrund der beschriebenen Ergebnisse, insbesondere aufgrund der Homogenität keine verlässlichen Bio-Marker für EMT oder vermehrte Invasivität. Insgesamt ist es nötig, dass zukünftig genauere quantitative Daten zu den Expressionsraten durch Studien mit einer größeren Anzahl an Tumورproben von unterschiedlichen Krankheitsstadien ermittelt werden. Dabei sollten verschiedene Hersteller von Antikörpern verglichen werden, um ihre Spezifität zu testen.

Die homogene Verteilung der Transkriptionsfaktoren kann einerseits eine ubiquitär ablaufende EMT bedeuten. Andererseits könnte die hier gewählte Definition vom Tumorzentrum und der Tumorperipherie nicht der Tumorbilogie entsprechen. Wie auch schon andere Autoren zeigten, war eine vermehrte Expression von Snail zum Beispiel dann aufgetreten, wenn die Tumorzellen an Stroma angrenzten (Wever, Pauwels et al. 2008). Da aber Mammakarzinomzellen häufig in Tumorzuseln auftreten, ist die Tumorperipherie eventuell über die jeweils dem Stroma angrenzenden Tumorzellen zu definieren und nicht als innen und außen gemessen von der Gesamttumormitte. So würde man bei diesem Modell bei TMA Stanzen von außen und innen des Tumors, gemessen von der Tumormitte (wie im linken Beispiel des Schaubildes), keinen Unterschied in der Expression der Marker und in dem Vorhandensein einer Invasionsfront feststellen. Die Ergebnisse dieser Studie spiegeln wider, dass das in der **Abbildung 22** links dargestellte Modell der Invasionsfront des Tumors eher der wahren Tumorbilogie entspricht. Die erhobenen Ergebnisse müssten folglich in Studien auch zu weiteren solide wachsenden Tumoren, wie zum Beispiel dem Plattenepithelkarzinom untersucht werden, um die Tumorbilogie und die Invasion von Tumoren in ihre Umgebung näher zu ergründen und bestimmen zu können (Alkatout, Naumann et al. 2011; Kahlert, Nikkhah et al. 2012; Mathias, Gopal et al. 2012; Stewart and McCluggage 2013).

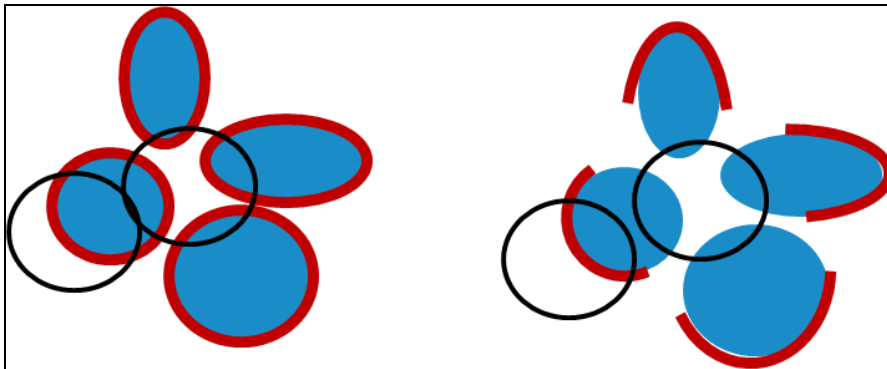


Abbildung 22: Unterschiedliche Vorstellungen zum Vorkommen der Invasionsfront des Tumors: die rote Linie symbolisiert die Invasionsfront, die blauen Kreise die Tumorzellnester. Die schwarzen Kreise zeigen den jeweils für die TMA gestanzten Bereich, wenn man eine Stanze außen und eine innen gemessen von der Tumormitte entnimmt.

Entsprechend der bisherigen Literaturangaben konnten auch in dieser Arbeit nur vereinzelt $CD20^+$ Zellen in Tumornestern nachgewiesen werden. B-Zellen Infiltrate scheinen im Mammakarzinom nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Zhang, Schiller et al. 1998; Demaria, Pikarsky et al. 2010). Zhang et al. stellen weiterhin dar, dass die prädominierende Zellen der Immunantwort im Brustkrebs Makrophagen und $CD3^+$ Zellen, also T-Zellen sind. Diese waren vor allem im Stroma um Tumorinseln zu finden, seltener aber auch in den Tumornestern. Diese Zellen nannten sie Tumor-infiltrierende-Lymphozyten (TIL). Das Vorhandensein von TIL wird je nach Studie positiv oder negativ betrachtet (Murri, Hilmy et al. 2008; Zlobec 2009). DeNardo et al. beschreiben eine unterschiedliche Assoziation der Prognose des Mammakarzinoms für Th1 und Th2 $CD4^+$ Zellen. Dabei seien vor allem die Th2 T-Helfer Zellen zusammen mit regulatorische T-Zellen für die chronische Entzündung verantwortlich und damit für ein Krankheitsfortschreiten. Hingegen werden die Th1-Zellen der akuten Inflammation zugeordnet und können so dem Tumorwachstum entgegenwirken (DeNardo and Coussens 2007).

TIL, die FoxP3 positiv waren, machten in der vorliegenden Untersuchung im Durchschnitt nur 0,55% der Tumormasse aus und kamen mit einer gleichen Verteilung im Tumorzentrum und der Tumorperipherie vor. In früheren Studien konnte eine heterogene Verteilung der FoxP3 positiven Zellen beschrieben werden (Ghebeh, Barhoush et al. 2008). Dass die regulatorischen T-Zellen eher selten in den hauptsächlich untersuchten T1 N0 Tumoren zu finden sind, ist eventuell damit zu erklären, dass FoxP3 positive Zellen vor allem in Tumoren in fortgeschrittenen Stadien und Lymphknotenbefall vorkommen (Ghebeh, Barhoush et al.

2008; Droeser, Zlobec et al. 2012). Zudem kann die Methode nur TIL zu werten eine Erklärung für die niedrige Zahl der regulatorischen T-Zellen geben. Denn wie Zhang et al. beschreiben, befindet sich die Mehrzahl der Leukozyten im Tumor umgebenden Stroma (Zhang, Schiller et al. 1998). FoxP3 positive Zellen können andere Immunzellen regulieren und dienen normalerweise zur Inaktivierung von autoreaktiven T-Lymphozyten, indem sie die Proliferation dieser T-Zellen und ihrer Zytokinausschüttung hemmen (Ghebeh, Barhoush et al. 2008; Nair, Aldrich et al. 2013). Ghebeh et al. postulierten, dass FoxP3 positive Zellen aber auch die Tumor spezifische Immunabwehr hemmen (Ghebeh, Barhoush et al. 2008). Diese Theorie ist im Einklang mit der mehrfach beschriebenen Korrelation von einer hohen Anzahl FoxP3⁺ Zellen, also regulatorische T-Zellen, mit einer schlechten Prognose, erhöhter Invasivität und einer erhöhten Auftretenswahrscheinlichkeit von Metastasen (Gupta, Joshi et al. 2007; Ghebeh, Barhoush et al. 2008; Suzuki, Chikazawa et al. 2010; Kim, Jeong et al. 2012). Die Theorie der hemmenden FoxP3⁺ Zellen in Bezug auf die Tumor spezifische Immunabwehr wurde am Beispiel des Cervix-Karzinoms von Curiel et al. nachgewiesen. Folglich schlug die Arbeitsgruppe weiter vor, dass eine neue Karzinomtherapie die Blockung der regulatorischen T-Zellen sein kann (Curiel, Coukos et al. 2004). Im Mausmodell hatte sich diese Theorie schon über eine Antikörpergabe gegen regulatorische T-Zellen als ein effizienter Ansatz erwiesen (Liyanage, Moore et al. 2002). Eine alternative Hypothese besagt, dass die Tumor-infiltrierenden-Lymphozyten durch die Tumorzellen selbst inaktiviert werden und so der Tumor sich trotz Lymphozyteninfiltration der Immunabwehr entzieht (DeNardo and Coussens 2007).

Ebenfalls werden T-Zellen generell mit einem vermehrten Vorkommen in fortgeschrittenen Tumoren beschrieben (Murri, Hilmy et al. 2008). In der vorliegenden Studie mit T1 Mammakarzinomen wurden Tumor infiltrierende T-Zellen detektiert, die im Mittel 3,78% des Tumors ausmachten. Es konnte insgesamt kein heterogen verteiltes Vorkommen von TIL im Vergleich der TMA Stanzen vom Tumorzentrum und Tumorrand festgestellt werden. Auch Droeser et al. gelang es nicht, einen signifikanten Unterschied zwischen dem Vorkommen von FoxP3⁺ Zellen innen und außen im Tumor festzustellen (Droeser, Zlobec et al. 2012). Weiterhin konnte kein Einfluss des Vorhandenseins von TIL auf die Rezidivwahrscheinlichkeit entdeckt werden. Wiederum ist hier eine mögliche Erklärung das gewählte Tumorstadium ohne Lymphknotenbefall, denn auch Löfdahl et al. berichteten, dass es für Tumoren, die N0 sind, keinen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit abhängig vom Lymphozyteninfiltrat gibt (Löfdahl, Ahlin et al. 2012). Zudem zeigte die Methodik der

TMAAs auch eine homogene Verteilung der proliferierenden Zellen, die mit Ki67 angefärbt wurden.

Die Theorie, dass ein Tumor durch eine kleine Subpopulation gebildet werden kann, den Tumorstammzellen, ist schon 1858 von Virchow formuliert worden und wird heutzutage in vielen verschiedenen Tumorentitäten untersucht (Alkatout and Kalthoff 2008). In der vorliegenden Studie wurden $CD44^{+}/CD24^{-}$ und $CD49f^{+}/CD24^{+}$ als etablierte Markerkombinationen zur Tumorstammzelldetektion genutzt (Al-Hajj 2003; Vassilopoulos, Wang et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, dass Zellen mit den oben beschriebenen Oberflächeneigenschaften auch mit Hilfe der Immunfluoreszenz nachzuweisen sind. Die Anzahl der im Tumor vorkommenden potenziellen Tumorstammzellen variiert jedoch stark abhängig von der gewählten Markerkombination. Mit den Oberflächenproteinen $CD49f^{+}/CD24^{+}$ konnten 2,3% der Tumorzellen als potentielle Tumorstammzellen identifiziert werden, während die Kombination von $CD44^{+}/CD24^{-}$ etwa 18,5% Tumorstammzellen in den gleichen Tumoren aufwies. Die Ergebnisse aus der vorliegenden Studie zeigen eine Diskrepanz zu den Resultaten der aktuellen Literatur. Al Hajj, der das Tumorstammzellmodell auf das solide Mammakarzinom übertragen hat, postulierte, dass etwa 11-35% der Zellen eines Tumors das Profil $CD44^{+}/CD24^{-}$ tragen. Gupta et al. hingegen beschrieben 25% der Tumorzellen als Zellen mit Tumorstammzelleigenschaften. Honeth et al. konnten sogar zeigen, dass die Anzahl von $CD44^{+}/CD24^{-}$ Zellen im Tumor einen Anteil zwischen 0-100% der Tumorzellen ausmachen (Al-Hajj 2003; Honeth, Bendahl et al. 2008; Gupta, Chaffer et al. 2009). Eine mögliche Erklärung könnte darin begründet sein, dass die bereits publizierten Daten meist eine andere Methodik zu Grunde legten, die Durchflusszytometrie. Die Durchflusszytometrie, also die Sortierung von fluoreszenzmarkierten Zellen, ist der Goldstandard der Detektion der Tumorstammzellen. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings mit der Immunfluoreszenz eine Methode angewandt, die zusätzlich zur möglichst ebenso exakten Quantifizierung der Tumorstammzellen auch eine Identifikation derselben in situ ermöglichte. Somit sollten noch mehr Informationen über das biologische Verhalten von Tumorstammzellen gesammelt werden.

Insgesamt stehen die Ergebnisse der Studien mit den relativ hohen prozentualen Angaben von potenziellen Tumorstammzellen aber im Gegensatz zu der Annahme, dass Tumorstammzellen nur einen kleinsten Teil der Tumormasse ausmachen (Mani, Guo et al. 2008).

In der vorliegenden Untersuchung wiesen etwa 30% der Zellen des DCIS Zellen mit $CD44^{+}/CD24^{-}$ auf. Dies entspricht den Ergebnissen von Park et al. Auch sie stellten eine

erhöhte Tumorstammzellrate im DCIS im Vergleich zum invasiven Tumor fest (Park, Lee et al. 2010).

Die Definition der Tumorstammzelle basiert auf einem funktionellen Modell mit einem Xenograft (Al-Hajj 2003). Sie ist deshalb wesentlich von den Eigenschaften des Modells abhängig. Dies zeigen zum Beispiel die Ausführungen von Civenni et al. anhand der Modulation des Immunsystems des Modells (Civenni, Walter et al. 2011). Dies bedeutet allerdings, dass die Tumorstammzelldefinition relativ ist. Man muss bei weiterführenden, übertragenden Untersuchungen am Menschen bedenken, dass diese Tumorstammzelle anhand von Eigenschaften einer Maus funktionell getestet und definiert wurde. Es ist unwahrscheinlich, dass die Mikroumgebung der Maus identische Eigenschaften hat wie die Mikroumgebung des Menschen. Aber welche Zellpopulation schließlich im Menschen Tumorstammzeleigenschaften aufweist, ist unklar.

Es konnte auch in Bezug auf die Tumorstammzellen keine Heterogenität bezüglich der Lokalisation im Tumor nachgewiesen werden. Eine Erklärung kann dazu die zuvor beschriebene alternative Lokalisation der Invasionsfront an direkt angrenzendes Stroma sein, unabhängig von innen oder außen im Tumor (s. **Abbildung 22**).

Park et al. beschreiben, dass das Vorkommen von sogenannten Tumorstammzellen im Mammakarzinom mit einer schlechteren Prognose und einer höheren Wahrscheinlichkeit der Metastasierung assoziiert ist (Park, Lee et al. 2010). Auch die Expression von CD49f sei mit einer reduzierten Überlebenswahrscheinlichkeit verbunden (Friedrichs K. 1995; Meyer, Fleming et al. 2010). Die vorbeschriebene Assoziation von Tumorstammzellen mit einem schlechteren klinischen Verlauf, konnte wie schon in den Arbeiten von Honeth et al. und Mylona et al., in der vorliegenden Studie nicht gezeigt werden (Honeth, Bendahl et al. 2008; Mylona, Giannopoulou et al. 2008; Park, Lee et al. 2010). Möglicherweise war die hier untersuchte Probenzahl zu gering.

Aber entgegen der Erwartungen, dass potentiell Tumor-initiierende-Zellen nicht im physiologischen Epithelzellverband sind, konnten Tumorstammzellen nicht nur im invasiven Karzinom, sondern auch im DCIS und im normalen Brustdrüsengewebe gefunden werden. Dies wird ebenfalls durch vorherige Studien bestätigt (Friedrichs K. 1995; Abraham, Fritz et al. 2005). Aber welche Bedeutung haben Zellen mit demselben Immunphänotyp von Tumorstammzellen in normalem Epithelgewebe?

Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass CD24 positive Zellen eher luminal gelegene Zellen sind. CD49f hingegen war vor allem in basalen Zellen nachzuweisen. So zeigt der

Tumor eine intratumorale Heterogenität, die zwar mit der hier verwendeten TMA- Methode nicht statistisch signifikant nachweisbar ist, aber zuvor schon von anderen Autoren beobachtet wurde (Keller, Lin et al. 2010; Meyer, Fleming et al. 2010; Rauner and Barash 2012). Eine weitere nicht statistisch ausgewertete Auffälligkeit von manchen Tumoren war ein Zytokeratin-Verlust bei einigen Zellen. Da in der vorliegenden Studie nur CK7 positive Zellen in Bezug auf ihre Tumorstammzeleigenschaften ausgewertet wurden, könnten trotz der bisher schon hohen Tumorstammzellrate noch mehr Tumor-initiierende-Zellen im Tumor liegen, die kein Zytokeratin mehr aufweisen.

In der aktuellsten Literatur werden Zellen mit den Oberflächenmarkern $CD49f^+/CD24^+$ zunehmend auf den physiologischen Brustdrüsenstammzellen gefunden, die für die Umwandlung der weiblichen Brust in der Pubertät und in Schwangerschaften essentiell sind (Kaimala, Bisana et al. 2012). Dies erklärt zwar den Nachweis von $CD49f^+/CD24^+$ Zellen in normalem Brustdrüsengewebe, erschwert aber die Unterscheidung von Stammzellen zu Tumorstammzellen in malignen Zellen. Takebe et al. postulieren, dass gerade diese Progenitorzellen oder physiologischen Stammzellen aufgrund ihrer langen Lebensspanne anfällig sind für eine Akkumulation von DNA Mutationen und somit als Ursprung der Tumorstammzelle in Frage kommen (Takebe, Warren et al. 2011).

Die komplexen Mechanismen der Tumorprogression scheinen auch miteinander verknüpft zu sein. Die Arbeitsgruppe Mani et al. sahen eine Verbindung in den Mechanismen der EMT und der Tumorstammzelle. Sie induzierten über Twist und Snail in nicht-tumorbildenden Zellen eine EMT und fanden anschließend eine sehr hohe Anzahl $CD44^+/CD24^-$ Zellen über die Durchflusszytometrie (Mani, Guo et al. 2008). Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass Twist die Expression von CD24 mindert und damit die Anzahl von $CD44^+/CD24^-$ Zellen steigert (May CD 2011). Drasin et al. und Takebe et al. zeigten außerdem, dass in $CD44^+/CD24^-$ Zellen mehr EMT- Marker exprimiert werden als in Zellen mit einem anderen Immunphänotyp (Drasin DJ 2011; Takebe, Warren et al. 2011). In der vorliegenden Studie konnte aufgrund der homogenen Verteilung der EMT-Marker und der Tumorstammzellen keine Korrelation der beiden Mechanismen aufgezeigt werden.

Aber Tumorstammzellen sind nicht nur in der Tumorentstehung interessant. Sie gelten auch gegenüber der heutigen Therapien als resistenter im Vergleich zu nicht Tumor-bildenden Zellen (Al-Hajj 2003; Takebe, Warren et al. 2011). Zudem sind Tumor-initiierende Zellen resistenter gegenüber Apoptosesignalwegen (Alkatout, Kabelitz et al. 2008).

Draisin et al. beschreiben sogar, dass nach neoadjuvanter Chemotherapie mehr potentielle Tumorstammzellen mit $CD44^{+}/CD24^{-}$ zu finden seien, wobei unklar bleibt, ob die Chemotherapie Tumorstammzellen induziert oder nur die $CD44^{+}/CD24^{-}$ Zellen selektiert (Draisin DJ 2011). Es ist wichtig die Tumorstammzelle weiter zu erforschen, um auch gezielt Therapiestrategien gegen Tumor-initiierende Zellen zu entwickeln. Dafür wird allerdings ebenfalls eine neue Therapiekontrolle nötig sein, da Tumorstammzellen nicht die Tumormasse ausmachen, sondern eventuell nur einzelne Zellen sind.

5. Zusammenfassung

In den vorliegenden Untersuchungen konnte mittels TMA-Untersuchung eine Homogenität der EMT-Transkriptionsfaktoren Snail, Slug, Twist und Zeb1 im Mammakarzinom in Bezug auf die Tumorperipherie im Verhältnis zum Tumorzentrum gezeigt werden. Zusätzlich zeigte sich eine homogene Verteilung der Marker bei Patienten mit Rezidiven im Vergleich zu Patienten ohne Rezidiv. Außerdem hat insbesondere Snail, zusätzlich zum homogenen Muster, hohe Expressionslevel im Mammakarzinom wie auch im DCIS und im Normalgewebe. Dies deutet darauf hin, dass die gewählten Transkriptionsfaktoren alleine nicht spezifisch genug sind zur Untersuchung der EMT. Andererseits ist eine Vertiefung der Untersuchung an einem größeren Kollektiv unter dem Einschluss von mehr TNM Stadien sinnvoll.

Insgesamt zeigte sich ein geringes Vorkommen von Tumor-Infiltrierenden Leukozyten im Mammakarzinom. Vor allem B-Zellen und regulatorische T-Zellen kamen wenig innerhalb der Tumornester vor. Alle untersuchten lymphatischen Marker kamen im vorliegenden Untersuchungsgut homogen vor.

Zellen mit Tumorstammzeleigenschaften konnte mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen und lokalisiert werden. Die Lokalisation der Tumorstammzellen war homogen verteilt. Aufgrund der homogenen Verteilung konnte keine Relation von Tumorstammzellen zu EMT-Marker positiven Zellen nachgewiesen werden, wie sie in der aktuellen Literatur mehrfach beschrieben ist (Raimondi, Gianni et al. 2010; Kong, Li et al. 2011). Es wurden je nach untersuchter Oberflächenmarkerkombination statistisch signifikante Unterschiede der Häufigkeit der Tumorstammzellen im invasiven Mammakarzinom aufgezeigt. Dies legt nahe, dass es nicht nur einen Tumorstammzellphänotyp gibt. Die Detektion der Tumorstammzellen sollte durch weitere ergänzende Marker verbessert werden, um Tumorstammzellen sicher und spezifisch zu lokalisieren. Zudem wird die weitere Untersuchung der Tumorstammzellen in verschiedenen Karzinomen nötig sein, denn derzeitige Ergebnisse zur Tumorstammzellforschung zeigen, dass die Tumorstammzellmarker je nach Tumorgewebe variieren (Civenni, Walter et al. 2011; Tirino, Desiderio et al. 2013). Außerdem könnte in zukünftigen Studien überprüft werden, ob das von Al Hajj et al. beschriebene Experiment auch mit anderen Mikroumwelteinflüssen als denen der Maus funktioniert. Diese weiterführenden Untersuchungen werden nötig sein, um die Tumorstammzellen als klinischen Marker in der Tumorbeurteilung einzusetzen.

6. Literaturverzeichnis

- Abraham, B. K., P. Fritz, et al. (2005). "Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis." Clin Cancer Res **11**(3): 1154-1159.
- Al-Hajj, M. (2003). "From the Cover: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(7): 3983-3988.
- Alkatout, I., D. Kabelitz, et al. (2008). "Prowling wolves in sheep's clothing: the search for tumor stem cells." Biological Chemistry: 799-811.
- Alkatout, I. and H. Kalthoff (2008). Tumor Stem Cells: How to Define Them and How to Find Them? Stem Cells: From Hydra to Man. T. C. G. Bosch, Springer Science: 165-185.
- Alkatout, I., C. M. Naumann, et al. (2011). "Squamous cell carcinoma of the penis: predicting nodal metastases by histologic grade, pattern of invasion and clinical examination." Urol Oncol **29**(6): 774-781.
- AWMF. (2012). "Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms." 2012, from http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OL_k_S3_Brustkrebs_Mammakarzinom_Diagnostik_Therapie_Nachsorge_2012-07.pdf.
- Aziza Nassar, M., Anuradha Radhakrishnan, MD (2010). "Intratumoral Heterogeneity of Immunohistochemical Marker Expression in Breast Carcinoma." Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology **18**: 433-441.
- Behnsawy, H. M., H. Miyake, et al. (2012). "Expression patterns of epithelial-mesenchymal transition markers in localized prostate cancer: significance in clinicopathological outcomes following radical prostatectomy." BJU Int.
- Brabletz, T. (2001). "Variable beta -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(18): 10356-10361.
- Brabletz, T., F. Hlubek, et al. (2005). "Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin." Cells Tissues Organs **179**(1-2): 56-65.
- Civenni, G., A. Walter, et al. (2011). "Human CD271-Positive Melanoma Stem Cells Associated with Metastasis Establish Tumor Heterogeneity and Long-term Growth." Cancer Research **71**(8): 3098-3109.
- Collins, A. T. (2005). "Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells." Cancer Research **65**(23): 10946-10951.
- Come, C., F. Magnino, et al. (2006). "Snail and Slug Play Distinct Roles during Breast Carcinoma Progression." Clinical Cancer Research **12**(18): 5395-5402.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." Nature **420**(6917): 860-867.
- Curiel, T. J., G. Coukos, et al. (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." Nature Medicine **10**(9): 942-949.
- Demaria, S., E. Pikarsky, et al. (2010). "Cancer and Inflammation: Promise for Biologic Therapy." Journal of Immunotherapy **33**(4): 335-351.
- DeNardo, D. G. and L. M. Coussens (2007). "Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression." Breast Cancer Research **9**(4): 212.

- Drasin DJ, T. P. R. a. H. L. F. (2011). "Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity." Breast Cancer Research **13**: 226.
- Droeser, R., I. Zlobec, et al. (2012). "Differential pattern and prognostic significance of CD4+, FOXP3+ and IL-17+ tumor infiltrating lymphocytes in ductal and lobular breast cancers." BMC Cancer **12**: 134.
- Fang, D. (2005). "A Tumorigenic Subpopulation with Stem Cell Properties in Melanomas." Cancer Research **65**(20): 9328-9337.
- Friedrichs K., R. P. (1995). "High Expression Level of $\alpha 6$ Integrin in Human Breast Carcinoma Is Correlated with Reduced Survival." Cancer Research **55**: 901-906.
- Fu, Z., Y. Zuo, et al. (2013). "The crosstalk: Tumor-infiltrating lymphocytes rich in regulatory T cells suppressed cancer-associated fibroblasts." Acta Oncol.
- Geradts, J., A. G. de Herreros, et al. (2011). "Nuclear Snail1 and nuclear ZEB1 protein expression in invasive and intraductal human breast carcinomas." Human Pathology **42**(8): 1125-1131.
- Ghebeh, H., E. Barhoush, et al. (2008). "FOXP3+ Tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy." BMC Cancer **8**(1): 57.
- Gort, E. H., K. P. Suijkerbuijk, et al. (2008). "Methylation of the TWIST1 promoter, TWIST1 mRNA levels, and immunohistochemical expression of TWIST1 in breast cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **17**(12): 3325-3330.
- Greenburg, G. and E. D. Hay (1982). "Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells." J Cell Biol **95**(1): 333-339.
- Gupta, S., K. Joshi, et al. (2007). "Intratumoral FOXP3 expression in infiltrating breast carcinoma: Its association with clinicopathologic parameters and angiogenesis." Acta Oncologica **46**(6): 792-797.
- Hannemann, J., A. Velds, et al. (2006). "Classification of ductal carcinoma in situ by gene expression profiling." Breast Cancer Research **8**(5): R61.
- Honeth, G., P.-O. Bendahl, et al. (2008). "The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors." Breast Cancer Research **10**(3): R53.
- Kahlert, U. D., G. Nikkhah, et al. (2012). "Epithelial-to-Mesenchymal (-like) Transition as a Relevant Molecular Event in Malignant Gliomas." Cancer Lett.
- Kaimala, S., S. Bisana, et al. (2012). "Mammary gland stem cells: more puzzles than explanations." J Biosci **37**(2): 349-358.
- Keller, P. J., A. Lin, et al. (2010). "Mapping the cellular and molecular heterogeneity of normal and malignant breast tissues and cultured cell lines." Breast Cancer Research **12**(5): R87.
- Kim, C. F., E. L. Jackson, et al. (2005). "Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer." Cell **121**(6): 823-835.
- Kim, S. T., H. Jeong, et al. (2012). "Tumor-infiltrating Lymphocytes, Tumor Characteristics, and Recurrence in Patients With Early Breast Cancer." Am J Clin Oncol.
- Kong, D., Y. Li, et al. (2011). "Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins?" Cancers **3**(4): 716-729.
- Lapidot, T., C. Sirard, et al. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." Nature **367**(6464): 645-648.
- Li, C., D. G. Heidt, et al. (2007). "Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells." Cancer Research **67**(3): 1030-1037.
- Liyanage, U. K., T. T. Moore, et al. (2002). "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma." J Immunol **169**(5): 2756-2761.

- Löfdahl, B., C. Ahlin, et al. (2012). "Inflammatory cells in node-negative breast cancer." Acta Oncol **51**(5): 680-686.
- Lüllmann-Rauch, R. (2006). Histologie, Thieme.
- Makdissi, F. B., L. V. Machado, et al. (2009). "Expression of E-cadherin, Snail and Hakai in epithelial cells isolated from the primary tumor and from peritumoral tissue of invasive ductal breast carcinomas." Braz J Med Biol Res **42**(12): 1128-1137.
- Mani, S. A., W. Guo, et al. (2008). "The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells." Cell **133**(4): 704-715.
- Mani, S. A., J. Yang, et al. (2007). "Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(24): 10069-10074.
- Mathias, R. A., S. K. Gopal, et al. (2012). "Contribution of cells undergoing epithelial-mesenchymal transition to the tumour microenvironment." J Proteomics.
- May CD, S. N. (2011). "Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously duo in breast cancer progression." Breast Cancer Research **13**: 202.
- Meyer, M. J., J. M. Fleming, et al. (2010). "CD44posCD49fhiCD133/2hi Defines Xenograft-Initiating Cells in Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer." Cancer Research **70**(11): 4624-4633.
- Micalizzi, D. S., S. M. Farabaugh, et al. (2010). "Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression." Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia **15**(2): 117-134.
- Mimeault, M. and S. K. Batra (2013). "Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells." J Cell Mol Med **17**(1): 30-54.
- Mohammed, Z. M., J. J. Going, et al. (2012). "The relationship between components of tumour inflammatory cell infiltrate and clinicopathological factors and survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer." Br J Cancer **107**(5): 864-873.
- Morel, A. P., M. Lievre, et al. (2008). "Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition." PLoS One **3**(8): e2888.
- Murri, A. M. A., M. Hilmy, et al. (2008). "The relationship between the systemic inflammatory response, tumour proliferative activity, T-lymphocytic and macrophage infiltration, microvessel density and survival in patients with primary operable breast cancer." British Journal of Cancer **99**(7): 1013-1019.
- Mylona, E., I. Giannopoulou, et al. (2008). "The clinicopathologic and prognostic significance of CD44+/CD24-/low and CD44-/CD24+ tumor cells in invasive breast carcinomas." Human Pathology **39**(7): 1096-1102.
- Nair, S., A. J. Aldrich, et al. (2013). "Immunologic Targeting of FOXP3 in Inflammatory Breast Cancer Cells." PLoS One **8**(1): e53150.
- Nassar, A., A. Radhakrishnan, et al. (2010). "Intratumoral heterogeneity of immunohistochemical marker expression in breast carcinoma: a tissue microarray-based study." Appl Immunohistochem Mol Morphol **18**(5): 433-441.
- Neal, C. L., V. Henderson, et al. (2012). "Snail transcription factor negatively regulates maspin tumor suppressor in human prostate cancer cells." BMC Cancer **12**(1): 336.
- O'Brien, C. A., A. Pollett, et al. (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." Nature **445**(7123): 106-110.
- Park, S. Y., H. E. Lee, et al. (2010). "Heterogeneity for Stem Cell-Related Markers According to Tumor Subtype and Histologic Stage in Breast Cancer." Clinical Cancer Research **16**(3): 876-887.

- Prasad, C. P., G. Rath, et al. (2009). "Expression analysis of E-cadherin, Slug and GSK3 β in invasive ductal carcinoma of breast." BMC Cancer **9**(1): 325.
- Raimondi, C., W. Gianni, et al. (2010). "Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: revisiting minimal residual disease." Curr Cancer Drug Targets **10**(5): 496-508.
- Rauner, G. and I. Barash (2012). "Cell hierarchy and lineage commitment in the bovine mammary gland." PLoS One **7**(1): e30113.
- Robert-Koch-Institut. (2012, 12.05.12). "Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert Koch Institut, Brustkrebs." 2012, from http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html.
- Santisteban, M., J. M. Reiman, et al. (2009). "Immune-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition In vivo Generates Breast Cancer Stem Cells." Cancer Research **69**(7): 2887-2895.
- Schmalhofer, O., S. Brabletz, et al. (2009). "E-cadherin, β -catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer." Cancer and Metastasis Reviews **28**(1-2): 151-166.
- Singh, S. K., I. D. Clarke, et al. (2004). "Cancer stem cells in nervous system tumors." Oncogene **23**(43): 7267-7273.
- Soini, Y., H. Tuhkanen, et al. (2011). "Transcription factors zeb1, twist and snail in breast carcinoma." BMC Cancer **11**(1): 73.
- Stewart, C. J. and W. G. McCluggage (2013). "Epithelial-mesenchymal transition in carcinomas of the female genital tract." Histopathology **62**(1): 31-43.
- Stoyianni, A., A. Goussia, et al. (2012). "Immunohistochemical study of the epithelial-mesenchymal transition phenotype in cancer of unknown primary: incidence, correlations and prognostic utility." Anticancer Res **32**(4): 1273-1281.
- Suzuki, H., N. Chikazawa, et al. (2010). "Intratumoral CD8(+) T/FOXP3 (+) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer." Cancer Immunol Immunother **59**(5): 653-661.
- Takebe, N., R. Q. Warren, et al. (2011). "Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition." Breast Cancer Res **13**(3): 211.
- Tavassaoeli, F. A. and P. Davilee (2003). Tumors of the breast and female genital organs. Classification of tumours. Lyon, IARC WHO.
- Tirino, V., V. Desiderio, et al. (2013). "Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization." FASEB J **27**(1): 13-24.
- Vassilopoulos, A., R. H. Wang, et al. (2008). "Identification and characterization of cancer initiating cells from BRCA1 related mammary tumors using markers for normal mammary stem cells." Int J Biol Sci **4**(3): 133-142.
- Vesuna, F., P. van Diest, et al. (2008). "Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer." Biochemical and Biophysical Research Communications **367**(2): 235-241.
- Vieira, A. F., S. Ricardo, et al. (2012). "P-cadherin is coexpressed with CD44 and CD49f and mediates stem cell properties in basal-like breast cancer." Stem Cells **30**(5): 854-864.
- Vincent, T., E. P. A. Neve, et al. (2009). "A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition." Nature Cell Biology **11**(8): 943-950.
- Weigelt, B., J. L. Peterse, et al. (2005). "Breast cancer metastasis: markers and models." Nature Reviews Cancer **5**(8): 591-602.
- Wever, O., P. Pauwels, et al. (2008). "Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front." Histochemistry and Cell Biology **130**(3): 481-494.

- Zhang, X. D., G. D. Schiller, et al. (1998). "Lymphoid cell infiltration during breast cancer growth: a syngeneic rat model." Immunol Cell Biol **76**(6): 550-555.
- Zlobec, I. (2009). "Invasive front of colorectal cancer: Dynamic interface of pro-/anti-tumor factors." World Journal of Gastroenterology **15**(47): 5898.

7. Danksagung

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. Wolfram Klapper, der mir stets geduldig bei der Umsetzung der Arbeit geholfen hat und mir immer mit seinen Fachkenntnissen und seinem Verständnis zur Seite stand.

Desweiteren möchte ich PD Dr. Ibrahim Alkatout herzlich für seine verlässliche Hilfe, Geduld und nette Unterstützung danken, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit zu schreiben. Vielen Dank für die stetige Ermunterung und Anregungen auch in schwierigen Phasen.

Ich möchte mich sehr bei Prof. Dr. Jonat und Prof. Dr. Röcken für die Ermöglichung dieses Projektes und damit auch der Ermöglichung meiner Forschungstätigkeit bedanken. Vielen Dank insbesondere für den Zugang zu den Daten des Mammazentrums und die finanzielle Unterstützung für die Durchführung der Experimente.

Mein besonderer Dank gilt Frau Charlotte Botz-von-Drathen. Vielen Dank für die vielen Stunden, die warmherzige Unterstützung und die technische Hilfe bei den Färbungen. Ebenso möchte ich Olivera Batic danken, die mir bei der Herstellung der TMAs sehr geholfen hat und das Stanzen übernommen hat. Vielen Dank für die technische Hilfe, aber auch für die liebevollen Ratschläge. Auch Monika Szczepanowski und Monika Hauberg aus dem Institut für Pathologie und Sigrid Hamann aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe in Kiel möchte ich für ihre Mitwirkung und Unterstützung danken. Zudem danke ich Antonia Wenners und Frau Dr. Bauer für ihre Hilfe.

Vielen Dank auch an Karoline Koch, die mir geduldig viele Fragen beantwortete und oft Lösungen für technische Probleme kannte.

Nicht zuletzt gilt mein großer Dank meiner Familie, die es mir erst ermöglicht hat bis hier hin zu kommen und mich immer unterstützt hat.

8. Publikationen

- Alkatout, I., M. Wiedermann, et al. (2013). "Transcription factors associated with epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells in the tumor centre and margin of invasive breast cancer." Exp Mol Pathol **94**(1): 168-173.
- „Intratumorale Heterogenität beim Mammakarzinom? Homogene Expression der Epithelial to Mesenchymal Transition im Dedifferenzierungsprozess zur potentiellen Tumorstammzelle“
Alkatout I, Wiedermann M, Jonat W, Klapper W (2011) Postervortrag: XXII. Akademische Tagung deutschsprechender Hochschullehrer in der Gynäkologie und Geburtshilfe. Halle an der Saale, 25.-27.09.2011

9. Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name:	Meike Wiedermann
Geburtstag:	11.04.1987
Geburtsort:	Dortmund
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch
Eltern:	Hans Wiedermann, Elektromeister und Annette Wiedermann, Lehrerin

SCHULBILDUNG

1993 - 1997	Aplerbecker Mark-Grundschule in Dortmund
1997 - 2004	Gymnasium an der Schweizer Allee in Dortmund
2004 – 2006	Goethe Gymnasium in Dortmund
	Prüfungsfächer: Biologie, Italienisch, Deutsch, Pädagogik (1,4)

HOCHSCHULSTUDIUM

2006 - 2012	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts- Universität Kiel
2008	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1,5)
2012	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1,5)

PFLEGEDIENSTPRAKTIKUM

2007	Sankt Elisabeth Krankenhaus Kiel und Klinikum Dortmund
------	--

FAMULATUREN

2009	Innere Medizin, Klinikum Dortmund Diagnostische Radiologie, Klinikum Dortmund Pädiatrie, Uni SH, Campus Kiel
2010	Institut für Humangenetik, Kiel, Diagnostische Radiologie, Städt. Krankenhaus Kiel Pädiatrie, Praxis Dr. Lübke, Kronshagen
2011	Gynäkologie und Geburtshilfe, Uni SH, Campus Kiel

PRAKTISCHES JAHR

2011 - 2012	Innere Medizin (8 Wochen), Ospedale Regionale di Locarno La Carità, Lehrkrankenhaus der Universität Bern, Schweiz
	Innere Medizin (8 Wochen), Bristol Royal Infirmary, Department of Cardiology, England
	Pädiatrie, Städtisches Krankenhaus Kiel

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEITEN

Promotion:

- Institut für Pathologie (Leitung: Prof. Dr. med. Röcken)
„Intratumorale Homogenität der Epithelial-mesenchymalen Transition, des Tumorstammzellengehaltes und des lymphatischen Infiltrates in Mammakarzinomen“
Beginn: 2009

Publikationen:

- „Intratumorale Heterogenität beim Mammakarzinom? Homogene Expression der Epithelial to Mesenchymal Transition im Dedifferenzierungsprozess zur potentiellen Tumorstammzelle“
Alkatout I, Wiedermann M, Jonat W, Klapper W (2011) Postervortrag: XXII. Akademische Tagung deutschsprechender Hochschullehrer in der Gynäkologie und Geburtshilfe. Halle an der Saale, 25.-27.09.2011
- Alkatout, I., M. Wiedermann, et al. (2013). "Transcription factors associated with epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells in the tumor centre and margin of invasive breast cancer." Exp Mol Pathol **94**(1): 168-173.

WEITERBILDUNG

Seit 01.02.2013 Assistenzärztin in der Klinik für Diagnostische Radiologie, Universitätsklinikum Kiel

FREMDSPRACHEN

Englisch, Italienisch, Französisch (in Wort und Schrift)

AUSLANDSAUFENTHALTE

Juni- Oktober 2006: Italien, Elba (Au Pair)
August- Dezember 2011: 1. Tertial des Praktischen Jahres in Locarno, Schweiz und Bristol, England je 8 Wochen

STIPENDIUM

Stipendium der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zur Förderung der Ableistung des Praktischen Jahres im Ausland

HOBBIES

Standard- und Lateintanzen, Literatur